

**QUANTITATIVE
ELEKTRONENSTRAHLMIKROANALYSE
ZUR BESTIMMUNG VON ZELLULÄREN
ELEKTROLYTKONZENTRATIONEN
IN BIOLOGISCHEM WEICHGEWEBE**

Richard Bauer

1978

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr.med. Klaus Thureau

Quantitative Elektronenstrahlmikroanalyse zur Bestimmung
von zellulären Elektrolytkonzentrationen in biologischem
Weichgewebe



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr.rer.nat. Richard Bauer
aus
Garching
1978



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Thureau

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 11. 1978

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

1. Einführung

2. Geschichte und Entwicklung der Sozialwissenschaften

2.1 Die Bedeutung der Sozialwissenschaften

2.2 Die Sozialwissenschaften

2.3 Soziologie

2.4 Psychologie und Sozialwissenschaften

2.5 Ökonomie und Sozialwissenschaften

2.6 Recht und Sozialwissenschaften

2.7 Medizin und Sozialwissenschaften

3. Soziale Organisation

Meiner Frau Ulrike

3.1 Die Familie

3.2 Die Gruppe

3.3 Die Organisation

3.4 Die Gesellschaft

3.5 Die internationale Situation

3.6 Die soziale Integration

3.7 Die soziale Disintegration

4. Soziale Integration und soziale Disintegration

4.1 Soziale Integration

4.2 Soziale Disintegration

4.3 Soziale Integration und soziale Disintegration

4.4 Soziale Integration und soziale Disintegration

4.5 Soziale Integration und soziale Disintegration

4.6 Soziale Integration und soziale Disintegration

4.7 Soziale Integration und soziale Disintegration

5. Soziale Integration und soziale Disintegration

5.1 Soziale Integration

5.2 Soziale Disintegration

5.3 Soziale Integration und soziale Disintegration

5.4 Soziale Integration und soziale Disintegration

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	3
Methode und Probleme der Quantifizierung	
2 Die Methode der Elektronenstrahlmikroanalyse von Weichgewebe	6
2.1 Präparation	7
2.2 Meßanordnung im Rasterelektronenmikroskop	10
2.3 Entstehung von Röntgenstrahlen	13
2.4 Wahl des Röntgenstrahlenanalysators	15
2.5 Analyse gefriergetrockneter Dünnschnitte	18
3 Computerprogramm	21
3.1 Das Primärspektrum	22
3.2 Absorptionseffekte	24
3.3 Nachweis von Röntgenstrahlen	27
3.4 Impulshöhenanalyse	32
3.5 Gerätespezifische Einflüsse	33
3.6 Mathematisches Anpassungsverfahren	34
3.7 Beschreibung des weiteren Computerprogramms	37
4 Voraussetzungen der quantitativen Analyse	41
4.1 Verwendung von Dünnschnitten	42
4.2 Wahl der Beschleunigungsspannung	45
4.3 Lokale Inhomogenitäten in der Probe	51
4.4 Konstanz äußerer Parameter	55
4.5 Nicht-probenspezifische Anteile eines Röntgenspektrums	57
4.6 Linearität des Meßverfahrens	62
5 Quantifizierungsverfahren	65
5.1 Peak-zu-Untergrund	66
5.2 Interner Standard	67
5.3 Messung von Standardschnitten	69
5.4 Serienschnittmethode	73

	Seite
Intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen in der Rattenniere	
6 Experimentelle Ergebnisse	
6.1 Untersuchungsmaterial	76
6.2 Präparation	76
6.3 Meßtechnik	
6.4 Ergebnisse	82
7 Diskussion	96
7.1 Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren	97
7.2 Unterschiede zwischen Zellen im proximalen und im distalen Tubulus	99
7.3 Elektrolytkonzentrationen im Epithel des dünnen Teils der Henle-Schleife	100
7.4 Hinweise für einen aktiven Cl-Transport	101
7.5 Drei-Kompartiment-Modell	102
8 Zusammenfassung	104
9 Mathematischer Anhang	
9.1 Absorption in inhomogenem Material	106
9.2 Ersatz der Integration über die Absorptionskante durch die Fermifunktion	107
10 Verzeichnis von Abkürzungen und Symbolen	108
11 Literaturverzeichnis	109

1 Einleitung

Für viele physiologische Prozesse ist das intrazelluläre Elektrolytmilieu von Bedeutung. Intrazelluläre Reaktionen hängen wesentlich von den herrschenden intrazellulären Elektrolytkonzentrationen, transmembranal ablaufende Vorgänge von den vorliegenden Unterschieden der Elektrolytkonzentrationen im Intra- und Extrazellulärraum ab. Für das Aufrechterhalten dieser lebensnotwendigen Konzentrationsunterschiede sind aktive Transportmechanismen nötig. Zur näheren Charakterisierung und Unterscheidung der verschiedenen aktiven und passiven transmembranalen und transzellulären Transportsysteme ist die Kenntnis der an den Membranen anfallenden Konzentrations- und Aktivitätsunterschiede eine notwendige Voraussetzung.

Die Messung der extrazellulären Elektrolytkonzentrationen ist im allgemeinen einfach, während die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen auf erhebliche Schwierigkeiten stößt. Die mit chemischen oder radiochemischen Methoden bestimmten intrazellulären Elektrolytkonzentrationen in der Warmblüterniere sind mit großen Fehlern behaftet, wie ein Vergleich der Ergebnisse von Ruiz-Guinazu et al. /48/, Burg et al. /8/, Grantham et al. /27/ oder Khuri et al. /33/ zeigt. Die erheblichen Schwankungen erklären sich aus der Methode, bei der der Gehalt an intrazellulären Elektrolyten aus der Differenz der Elektrolyte im gesamten Gewebe und im Extrazellulärraum bestimmt wird. Die dafür notwendige Bestimmung des Extrazellulärraums ist aber nicht mit der erforderlichen Genauigkeit möglich, da es bis jetzt noch keine geeigneten Markierungssubstanzen für den Extrazellulärraum gibt /12, 24, 21/. Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt darin, daß mit ihr nur Mittelwerte aus verhältnismäßig großen Gewebearealen erhalten werden. Die Berechnung intrazellulärer Konzentrationen in einzelnen Zellen mit unterschiedlicher Funktion, wie z.B. im Nierengewebe, ist damit nicht möglich.

Mithilfe geeigneter ionensensitiver Elektroden können intra- und extrazelluläre Potentialdifferenzen und intrazelluläre Ionenaktivitäten

bestimmt werden (Khuri et al. /33/, Wiederholt et al. /59/, Sullivan et al. /55/ oder White /60/). Diese Methode ist jedoch nur für genügend große Zellen oberflächlicher Strukturen anwendbar. Außerdem ist noch nicht hinreichend geklärt, inwieweit Artefakte durch die Nähe des basolateralen Labyrinths im proximalen Tubulus oder allgemein durch die Verletzung der Zellmembran die Messungen beeinflussen. Ebenso ist noch ungeklärt, ob die beobachteten niedrigen Aktivitätskoeffizienten nur im Cytosol mit seiner besonderen Struktur vorliegen, oder ob diese sehr geringen Ionenaktivitäten auch an der Zellmembran selbst wirksam werden. /34, 60/.

Einen völlig anderen Zugang zur Bestimmung intrazellulärer Elektrolytkonzentrationen stellt die Methode der Elektronenstrahl-Mikroanalyse (EMA) dar, die schon seit mehreren Jahren von verschiedenen Autoren angewandt wird (z.B. Hall /30/, Dörge et al. /18 - 22/, Kriz et al. /36/ oder Ingram et al. /31/). Mithilfe dieser Methode ist es möglich, Elektrolytkonzentrationen von wenigen mM in zellulären oder subzellulären Kompartimenten von weniger als $1 \mu\text{m}^3$ Volumen zu messen. Allerdings ergeben sich bei der Anwendung dieser Methode in biologischem Weichgewebe eine Reihe von Schwierigkeiten bei der Quantifizierung der Meßdaten.

Im methodischen Teil der vorliegenden Arbeit werden diese Schwierigkeiten diskutiert und Beiträge zur Lösung der anstehenden Probleme geliefert. Um die in vivo-Verteilung der Elektrolyte bei der Präparation des Gewebes zu erhalten, wurde ein Schußapparat entwickelt, mit dem auch tiefere Schichten größerer Organe schockgefroren werden können.

Zur Auswertung der bei der EMA erhaltenen Röntgenspektren wurde ein Computerprogramm entwickelt, das eine schnelle und exakte Trennung der interessierenden Linienintensitäten der elementspezifischen 'charakteristischen Linien' von dem uncharakteristischen Röntgenuntergrund, der 'weißen Strahlung', ermöglicht. Eine exakte Trennung von Untergrund und Linien ist für die Auswertung von Spektren biologischer Gewebe besonders deswegen erforderlich, da einige interessie-

renden Elemente wie Na und Mg intrazellulär nur in niedrigen Konzentrationen vorkommen und darum nur geringe Linienintensitäten liefern, die somit schwer von den statistischen Fluktuationen des Untergrunds zu unterscheiden sind.

Um aus den Linienintensitäten die am Ort der Messung vorliegenden Elektrolytkonzentrationen berechnen zu können, ist ein geeignetes Quantifizierungsverfahren nötig. Ein mögliches Verfahren, das mit Hilfe von Serienschnitten arbeitet, wurde auf seine Anwendbarkeit hin an Standardschnitten getestet. Verschiedene Einflüsse, die die Quantifizierung beeinträchtigen können, wurden untersucht und werden diskutiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Methode der EMA angewandt, um intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen in verschiedenen tiefen Schichten und verschiedenen Strukturen der Rattenniere zu messen. Die erhaltenen Daten zeigen stärkere Unterschiede zwischen Intra- und extrazellulären Elektrolytkonzentrationen, als sie bisher mit chemischen Methoden oder mit ionensensitiven Elektroden bestimmt wurden. Außerdem konnten Unterschiede in der Elektrolytkonzentration in räumlich benachbarten, aber morphologisch und funktionell unterschiedlichen Strukturen derselben Nierenschicht festgestellt werden.

Methode und Probleme der Quantifizierung

2 Die Methode der Elektronenstrahlmikroanalyse von Weichgewebe

Bei der Elektronenstrahlmikroanalyse (EMA) werden Dünnschnitte des Untersuchungsmaterials in einem Rasterelektronenmikroskop bestrahlt. Dabei entstehen Röntgenstrahlen, die mit einem energiedispersiven Detektor aufgenommen werden. Die Analyse der Röntgenstrahlen erlaubt Rückschlüsse auf die elementare Zusammensetzung des Probenmaterials am Ort der Bestrahlung. Wegen der hohen Ortsauflösung des Rasterelektronenmikroskops und der hohen Empfindlichkeit des Röntgenanalyseystems können noch Elementmengen im fg- bis ag-Bereich (10^{-15} bis 10^{-18} g) nachgewiesen werden. Damit stellt die EMA eine Analysetechnik dar, die den Nachweis millimolarer Elementkonzentrationen in intra- und subzellulären Volumina gestattet.

Das biologische Untersuchungsmaterial wurde in einem Gemisch aus Propan und Isopentan bei 77.5 K schockgefroren, um die in vivo-Verteilung der diffusiblen Elektrolyte in oberflächlichen Gewebeschichten zu erhalten. Von geeigneten Gewebestücken wurden in einem Kryotom der Fa. Reichert, OM U2, mit einem Kühlzusatz der Fa. Shandon, FC 150, bei 180 K Gefrierschnitte von etwa 1 μm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden zwischen zwei 100 bis 200 nm dicken Folien aus Formvar oder Kollodium mechanisch stabil über der Öffnung eines Ni-Grids aufgespannt und bei 190 bis 200 K und 10^{-4} bis 10^{-5} T für mindestens sechs Stunden gefriergetrocknet.

Anschließend wurden die gefriergetrockneten Schnitte bei Raumtemperatur in einem Rasterelektronenmikroskop der Fa. Cambridge, Stereoscan S4, mit einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und Probenströmen von 0.5 bis 1 nA analysiert. Die Größe der bestrahlten Rasterfelder lag zwischen 1 und 10 μm^2 , die Analysezeit zwischen 200 und 400 s. Die in der Probe erzeugten Röntgenquanten wurden mit einem Detektor und Vielkanalanalysator der Fa. EDAX, später mit einem System der Fa. LINK, aufgenommen und analysiert. Die Spektren im Bereich von 0.6 bis 4 keV Röntgenenergie wurden in einen Computer der Fa. Digital Equipment, PDP 12 mit FPP, übertragen und mit einem FORTRAN-Programm in 2 bis 4 Minuten ausgewertet. Mithilfe eines geeigneten Quantifizierungsverfahrens wurden aus den Linienintensitäten die Elementkonzentrationen berechnet, die am Ort der Messung vorlagen.

2.1 Präparation

In biologischen Weichgeweben können eng benachbarte Kompartimente eine völlig unterschiedliche Zusammensetzung diffusibler Elemente aufweisen. Konzentrationsunterschiede, wie sie normalerweise für Na und K zwischen Intra- und Extrazellulärraum vorkommen, werden durch die Transporteigenschaften der Zellmembran aufrecht erhalten. Soll die in vivo-Verteilung von Elektrolyten bestimmt werden, muß eine Präparations- und Fixationsmethode angewandt werden, die das Verteilungsmuster der diffusiblen Elemente bewahrt. Die herkömmlichen Fixationsverfahren, die in der Licht- und Elektronenmikroskopie für histologische Zwecke benutzt werden, sind für diesen Zweck nicht geeignet. Die üblicherweise verwendeten chemischen Fixationsmittel wie Glutaraldehyd führen zu einer starken Beeinträchtigung des transmembranalen Transports /54, 62/ und damit zu einer Gleichverteilung der Elektrolyte im intra- und extrazellulären Raum.

Erfolgreich konnte bisher das Gewebe nur physikalisch durch Schockfrieren fixiert werden /2, 3, 13, 19, 30, 41/. Mit diesem Verfahren wird die in vivo-Verteilung der Elektrolyte zumindest in oberflächlichen Schichten bis einige 10 bis 100 μm von der Einfriereroberfläche entfernt erhalten. Nach dem Schockfrieren des Gewebes in einem geeigneten Kühlmittel wurden aus oberflächlichen Gewebebezirken etwa 1 μm dicke Gefrierschnitte hergestellt und anschließend gefriergetrocknet. Nach dem Gefriertrocknen können die Schnitte bei Raumtemperatur aufbewahrt und analysiert werden.

Als Kühlmittel wurde ein 77.4 K (Temperatur des siedenden Stickstoffs) kaltes Gemisch aus 20 bis 25 Vol% Isopentan und 75 bis 80 Vol% Propan benutzt. Ein gutes Kühlmittel muß einen möglichst tiefen Gefrierpunkt besitzen, damit der erzielbare Temperaturgradient zwischen Gewebe und Kühlmittel möglichst groß wird. Andererseits soll der Siedepunkt sehr hoch liegen, damit das Kühlmittel von dem warmen Gewebe nicht zum Verdampfen gebracht werden kann. Bilden sich nämlich beim Schockfrieren Gasblasen an der Gewebeoberfläche (Leidenfrost-Phänomen), dann wird der Wärmeabtransport aus dem Gewebe verzögert und das Einfrierergebnis sehr verschlechtert. Abb. 1 gibt den Verlauf der Gefrier- und Siedepunkte einer Propan-Isopentanmischung in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis wieder.

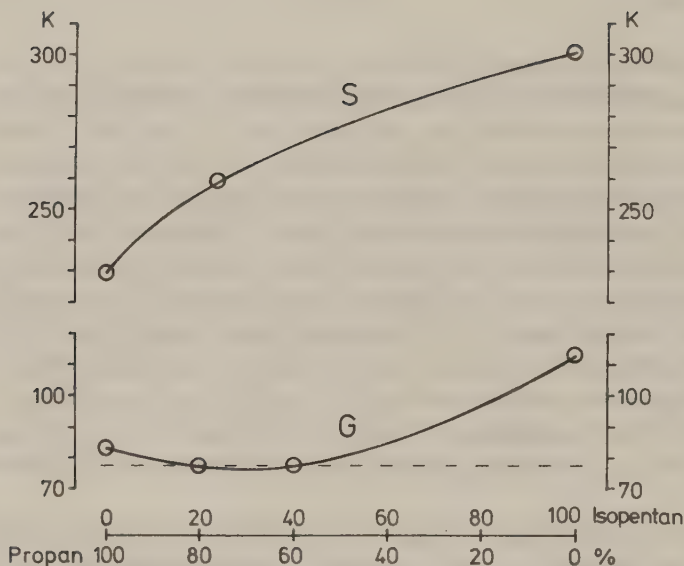


Abb. 1: Gefrier- und Siedepunkte eines Propan-Isopentangemisches in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis.

Während reines Propan nur auf max. 85.3 K und reines Isopentan sogar nur auf 113 K abgekühlt werden kann, ist das angegebene Gemisch aus Propan und 25% Isopentan auch noch bei der Temperatur des siedenden Stickstoffs von 77.4 K flüssig. Außerdem liegt der Siedepunkt um etwa 30 K über dem von reinem Propan. Darum können mit diesem Kühlmittel auch bei größeren Gewebestückchen, bei denen eine größere Wärmemenge abgeführt werden muß, noch sehr gute Einfrierergebnisse erzielt werden.

Von dem schockgefrorenen Gewebe wurden in einem Kryotom bei 180 K Dünnschnitte von etwa 1 μm Dicke hergestellt. Die wesentlichen Schritte der Schneidetechnik werden anhand von Abb. 2 erläutert. Abb. 2A zeigt ein Gewebestück in dem Präparatehalter. Von dem herausstehenden Gewebe wird ein Teil so weggetrimmt, daß ein kleiner Quader stehenbleibt, der auf einer Seite die Einfrieroberfläche F enthält. Von diesem Quader werden die Dünnschnitte hergestellt. Abb. 2B zeigt mehrere Schnitte auf dem Messerrücken unter dem Glasplättchen P liegen. Das Plättchen verhindert

ein Aufrollen der Schnitte beim Schneiden. Vom Messer werden die Schnitte mit einem Ni-Grid aufgenommen, über dessen ovaler Öffnung ein Formvar- oder Kollodiumfilm aufgespannt ist, Abb. 2C. Das Grid mit den anhaftenden Schnitten wird dann auf einer zweiten Folie abgelegt. Damit sind die Schnitte mechanisch stabil zwischen 2 Folien von zusammen etwa 100 nm Dicke eingespannt, wie Abb. 2D zeigt.

Anschließend werden die Schnitte bei 200 K und 10^{-4} bis 10^{-5} T gefriergetrocknet. Während der Sublimation des Wassers kristallisieren die Elektrolyte in der Matrix aus. Damit sind die Elektrolyte fixiert, und die Schnitte können bei Raumtemperatur aufbewahrt und analysiert werden, ohne daß störende Diffusionsprozesse befürchtet werden müssen.

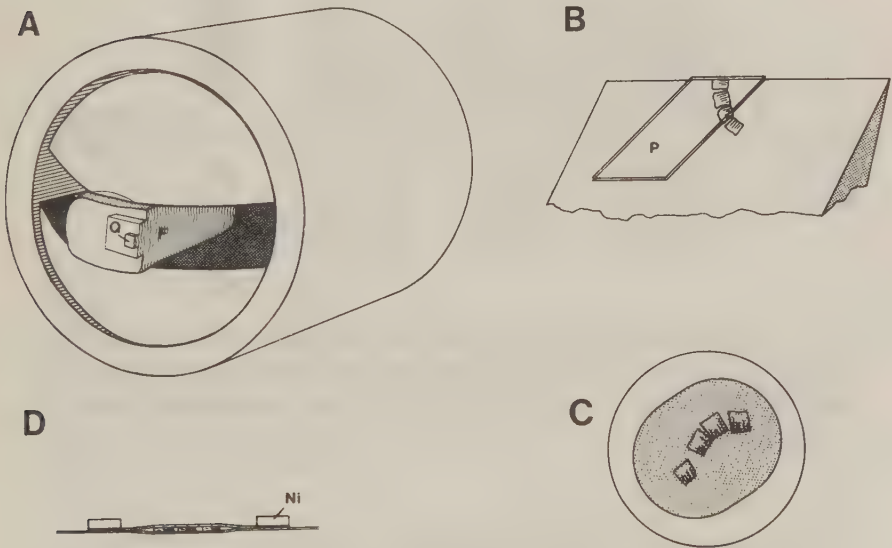


Abb. 2: Wichtige Schritte beim Gefrierschneiden des Gewebes.

- A: Ein Gewebestück mit dem herausgetrimmten Quader Q und der Einfrier-
oberfläche F, eingespannt in dem Präparatehalter.
- B: Mehrere Dünnschnitte auf dem Messerrücken unter dem Glasplättchen P.
- C: Dünnschnitte, die an der Folie über einem Ni-Grid anhaften.
- D: Zwischen 2 Folien in der Öffnung des Ni-Grids eingespannte Schnitte.
(mod. nach U.Bauer / 4 /).

2.2 Meßanordnung im Rasterelektronenmikroskop

Die gefriergetrockneten Dünnschnitte werden in einem Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert. Der wesentliche Vorteil dieser Technik liegt darin, daß die Meßstelle gleichzeitig elektronenoptisch beobachtet und röntgenanalytisch beurteilt werden kann. Abb. 3 gibt schematisch die Meßanordnung wieder. In der Elektronenquelle Q wird ein feiner Strahl hochenergetischer Elektronen erzeugt und mithilfe der Blenden B_{1-3} und der Spulen S_{1-3} auf das Target T fokussiert. Die transmittierten Elektronen werden mit dem Elektronendetektor E_1 und die reflektierten Elektronen mit E_2 aufgenommen. Die in der Probe erzeugten Röntgenstrahlen werden mit dem Röntgendetektor D nachgewiesen.

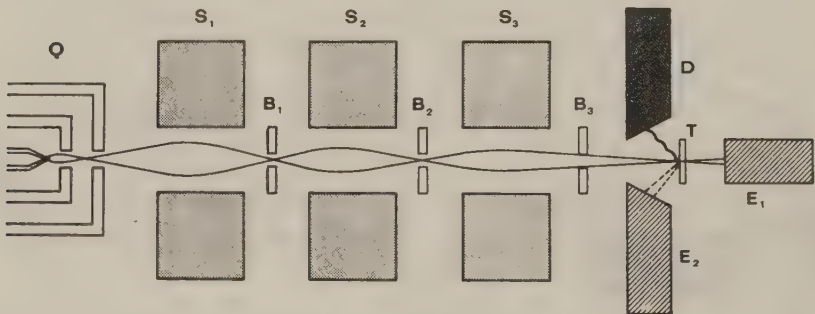


Abb. 3: Schema eines Rasterelektronenmikroskops mit Zusatz für Röntgenanalyse. Wichtige Bestandteile sind die Elektronenquelle Q, die Spulen S, die Blenden B, das Target T, die Elektronendetektoren E und der Röntgendetektor D.

Die genaue Anordnung von Probe, Probenbühne und Detektor ist in Abb. 4 dargestellt. Die gesamte Probenbühne C besteht aus Graphit. Am Rand der kreisrunden Bühne liegen die Ni-Grids Ni mit der Probe P in Vertiefungen über durchgehenden Bohrlöchern. Die hochenergetischen Elektronen e_0^- des Elektronenmikroskops erzeugen in der Probe Röntgenquanten γ_p , die durch das Be-Fenster Be treten und in dem Si-Detektor Si nachgewiesen werden. Ein Teil der Elektronen verläßt die Probe, ohne stark gestreut zu sein, und trifft auf den Szintillator S über dem Lichtleiter L. Die in S

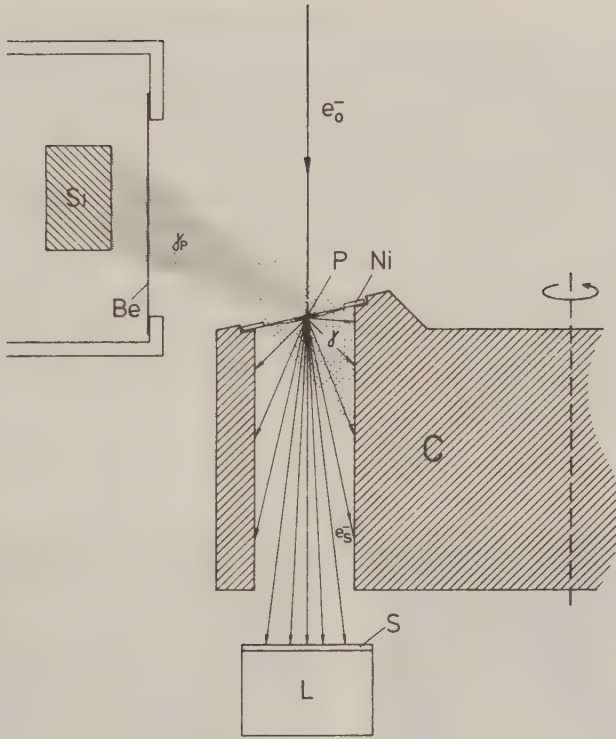


Abb. 4: Anordnung von Probe, Probenbühne und Röntgendetektor.

Die Symbole bedeuten: P Probe, C Probenbühne, Si Detektor, Ni Ni-Grid, e_o^- und e_s^- anregende und gestreute Elektronen, γ_p und γ probenspezifische bzw. nicht-probenspezifische Röntgenquanten, S Szintillator, L Lichtleiter und Be Be-Fenster.

angeregten Lichtquanten werden über den Lichtleiter L zu einem Sekundärelektronenvervielfacher weitergeleitet und dienen der Erzeugung des Transmissionsbildes. Die in der Probe gestreuten Elektronen e_s^- werden größtenteils in der Wand des Bohrlochs absorbiert. Bei der Absorption können Röntgenquanten γ entstehen, die zum Teil durch die Öffnung des Ni-Grids austreten und ebenfalls im Si-Detektor nachgewiesen werden können. Ihr Beitrag zu den Röntgenspektren ist aber gering, wie in Teil 4.6 gezeigt wird.

Bei der Analyse tastet der Elektronenstrahl ein bestimmtes Feld des Targets Punkt für Punkt und Zeile für Zeile ab. Mit dem Rastersignal und mit dem Signal des Detektors E_1 wird das Transmissionsbild als Bild der elektronenoptischen Dichte der Probe erzeugt. Abb. 5 stellt zwei Bilder von Schnitten aus der Nierenrinde einander gegenüber, ein Rastertransmissionsbild eines etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ dicken gefriergetrockneten Schnitts (Abb. 5A) und ein elektronenmikroskopisches Bild eines normal gefärbten und fixierten Schnitts (Abb. 5B). Zwar sind im gefriergetrockneten Schnitt weniger Einzelheiten zu erkennen als im herkömmlich gefärbten und fixierten Schnitt, jedoch können die hellen Kerne, intrazelluläre Vakuolen und der Bürstensaum auch im Gefrierschnitt gut vom übrigen Cytoplasma abgegrenzt werden.

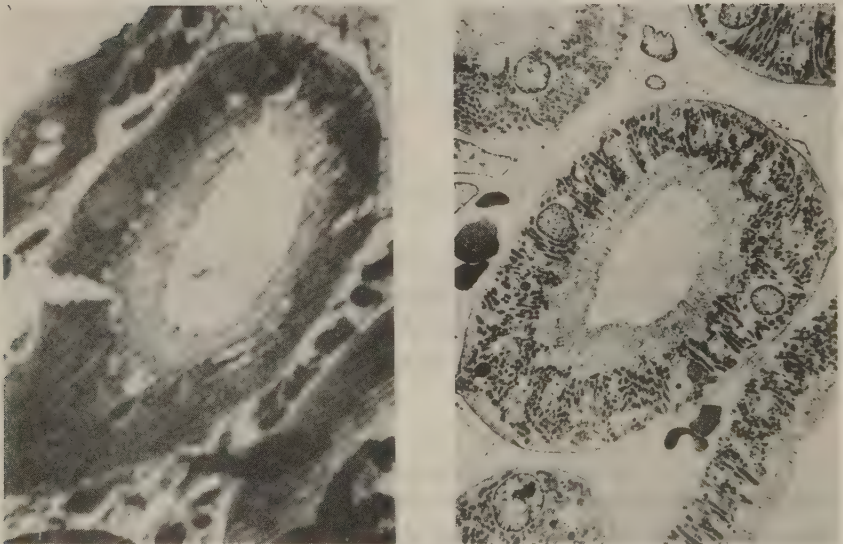


Abb. 5: Zwei elektronenmikroskopische Bilder von Dünnschnitten proximaler Tubuli der Rattenniere (Vergrößerung ca. 1000 fach)
A) $1\text{ }\mu\text{m}$ dicker gefriergetrockneter Schnitt
B) herkömmlich gefärbter und fixierter Schnitt (aus /42/).

2.3 Entstehung von Röntgenstrahlen

Bei dem Beschuß von Materie mit hochenergetischen Elektronen führen zwei verschiedene Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Targetmaterial zur Entstehung von Röntgenstrahlen, wie in Abb. 6 dargestellt ist. Die Elektronen e_0^- können aus der inneren Schale eines Atoms ein Elektron e_K^- herausschlagen. Dabei wird dem Atom die Ionisierungsenergie E_i zugeführt. Das freigewordene Niveau wird dann von einem Hüllenelektron aus einer höheren Schale besetzt. Die Energiedifferenz zwischen beiden Elektronenniveaus kann in Form eines Röntgenquants abgestrahlt werden (Abb. 6A). Beim Übergang eines Elektrons aus der L- oder M-Schale in die K-Schale wird somit die $K\alpha$ - oder $K\beta$ -Strahlung emittiert. Sie wird 'charakteristische Strahlung' genannt, da ihre Energie nach dem Gesetz von Moseley $\sqrt{E_K} = \text{const.} \cdot (Z-1)^2$ für jedes Element mit der Ordnungszahl Z charakteristisch ist. Wegen der linienförmigen Begrenzung der Strahlung auf einen Bereich von wenigen 10^{-3} eV spricht man auch von 'Linienspektrum'. Analog entsteht beim Übergang aus einer höheren Schale (M, N usw.) in die L- oder M-Schale die L- bzw. M-Strahlung.

Die Energie der K-Strahlung der biologisch relevanten leichten Elemente Na bis Ca liegen in dem Bereich zwischen 1 und 4 keV. Das Intensitätsverhältnis zwischen der $K\beta$ - und der $K\alpha$ -Strahlung wird Verzweigungsverhältnis genannt und ist für jedes Element eine feste Zahl. Die Ionisierungsenergien, die Energien der charakteristischen Linien und die Verzweigungsverhältnisse b_i sind für die Elemente Na bis Ca in Tab. 1 aufgeführt.

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca
E_i	1.073	1.305	1.560	1.839	2.145	2.472	2.823	3.607	4.038
$E\alpha$	1.041	1.254	1.486	1.739	2.013	2.307	2.621	3.311	3.688
$E\beta$	1.071	1.302	1.557	1.836	2.139	2.466	2.816	3.590	4.020
b_i	0.000	0.013	0.020	0.027	0.045	0.060	0.080	0.122	0.150

Tab. 1: Ionisierungsenergien E_i , Energien $E\alpha$ und $E\beta$ der charakteristischen $K\alpha$ - und $K\beta$ -Linien (keV) und Verzweigungsverhältnisse b_i für die Elemente Na bis Ca (aus /50/ und eigene Messungen).

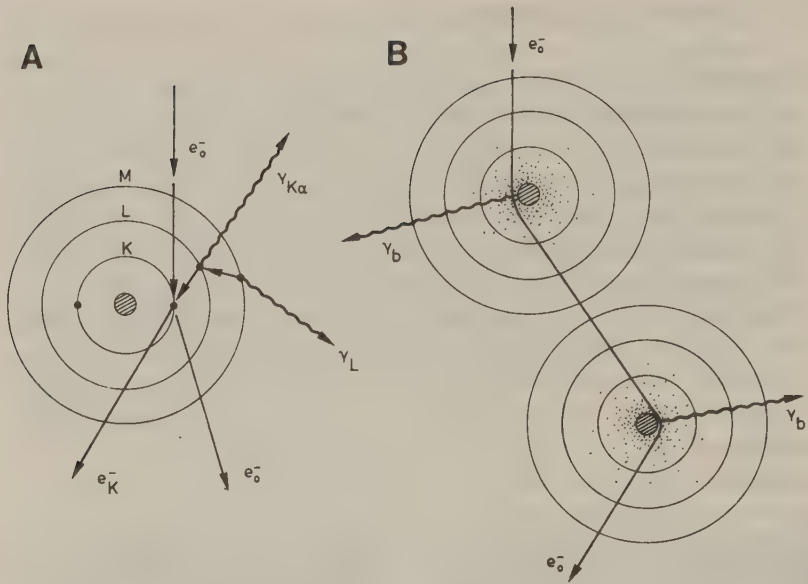


Abb. 6: Anregung von Röntgenquanten durch Elektronen

A: Entstehung der Linienstrahlung ($\gamma_{K\alpha}$, γ_L)

B: Entstehung der Bremsstrahlung γ_b

Ein angeregtes Atom kann seine überschüssige Energie nicht nur in Form eines Röntgenquants, sondern auch durch Emission eines Elektrons der äußeren Hülle abführen. Die dabei emittierten Elektronen werden als Fluoreszenz- oder 'Auger'-Elektronen bezeichnet. Mit abnehmender Ordnungszahl nimmt der Auger-Effekt gegenüber der Röntgenemission stark zu (vergl. Teil 4.3).

Die zweite Möglichkeit der Bildung von Röntgenquanten basiert auf einer unspezifischen Wechselwirkung der Elektronen e_0^- mit dem elektrischen Feld der Atomkerne. Durch die Abbremsung der Elektronen wird Energie frei, die wieder in Form eines Röntgenquants γ_b abgestrahlt wird (Abb. 6B). Diese Quanten enthalten kontinuierlich variable Energiebeträge. Das von ihnen gebildete Spektrum nennt man darum 'Kontinuum', 'weiße Strahlung' oder nach seiner Entstehung 'Breemsspektrum'.

2.4 Wahl des Röntgenstrahlenanalysators

Der Nachweis der Röntgenstrahlen kann nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen (Abb. 7). Bei der wellenlängendispersiven Analyse (WDA) treffen die Röntgenstrahlen auf einen geeigneten Kristall C und werden entsprechend ihrer Wellenlänge λ in einem bestimmten Winkel reflektiert. Mit dieser Anordnung kann eine spektrale Auflösung von wenigen eV erreicht werden. Bei der energiedispersiven Analyse (EDA) trifft ein Röntgenquant auf einen Halbleiterkristall D und erzeugt einen elektrischen Impuls, der seiner Energie direkt proportional ist. Die elektrischen Impulse werden in einem Vielkanalanalysator A nach ihrer Impulshöhe analysiert und gespeichert. Mit dieser Analysetechnik kann bei einer Röntgenenergie von 1 bis 4 keV eine Auflösung von 100 bis 150 eV Halbwertsbreite erreicht werden. Der Vorteil der EDA, simultan ein ganzes Spektrum zu liefern, könnte bei der WDA durch gleichzeitige Verwendung mehrerer Analysesysteme kompensiert werden.

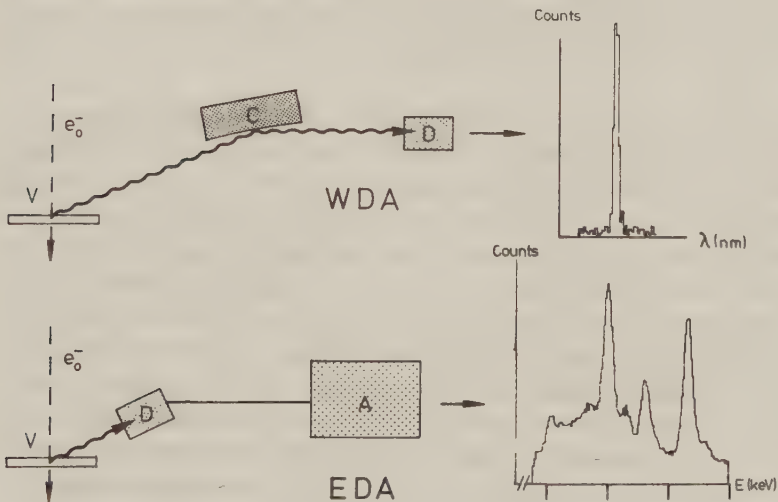


Abb. 7: Vergleich der wellenlängen- (WDA) mit der energiedispersiven (EDA) Nachweismethode. Angeregtes Probenvolumen V, Detektor D, Analysator A, Reflexionskristall C und zwei typische Spektren.

	WDA	EDA
Auflösung (eV)	1 - 3	100 - 150
Empfindlichkeit (mg/kg)	4 - 10	200 - 500
erfaßter Raumwinkel	10^{-4}	0.1 - 1
Nachweisgrenze (10^{-18} g, Volumen = $0.1 \mu\text{m}^3$)	1000	20

Tab. 2: Vergleich der wellenlängen- (WDA) mit der energiedispersiven (EDA) Analysetechnik (mod. nach A. Dörge /18/).

Die Daten beider Analysesysteme sind in Tab. 2 einander gegenübergestellt. Die Auflösung und damit die Empfindlichkeit der WDA ist um einen Faktor 100 besser als die der EDA. Aus geometrischen Gründen ist jedoch der Raumwinkel, der bei der WDA erfaßt wird, nur sehr klein, so daß die Nachweisgrenze der EDA um einen Faktor 50 - 100 niedriger liegt. Dies kann für den Nachweis niedrig konzentrierter intrazellulärer Elemente von Bedeutung sein. Die Menge von intrazellulärem Na in Volumina von $1 \mu\text{m}^3$ oder kleiner liegt normalerweise unter 10^{-16} g und damit unterhalb der Nachweisgrenze der WDA. Dagegen können solche kleinen Elementmengen mithilfe der EDA noch gut nachgewiesen werden.

Bei der von uns benützten Anordnung mit einer Beschleunigungsspannung von 15 kV, Strahlströmen von 0.5 bis 1 nA und Zählzeiten zwischen 200 und 400 s erzeugen Na-Konzentrationen von 100 mM in $1 \mu\text{m}$ dicken, gefriergetrockneten Schnitten etwa 100 charakteristische Impulse auf einem Untergrund von etwa 500 Impulsen. Dieses Na-Signal ist mit der in Teil 3 beschriebenen Computeranalyse der Spektren mit genügender Genauigkeit nachweisbar. Um dagegen mit der WDA ein Na-Signal zu erhalten, das sich mit wenigstens 10 Impulsen signifikant aus dem Untergrund von 0 - 2 Impulsen heraushebt, müßten die Zählzeiten oder der Strahlstrom um einen Faktor 50 bis 100 erhöht werden. Damit ergäben sich unrealistisch lange Zählzeiten von mehreren Stunden für ein einzelnes Spektrum oder aber Strahlbelastungen des Präparats, die dieses in Kürze zerstören würden.

Wegen der erwähnten niedrigen Konzentration bestimmter Elemente in biologischem Gewebe und wegen der darum zu erwartenden niedrigen Zählrate für die entsprechenden charakteristischen Linien haben wir uns für die

Anwendung der EDA entschieden. Diese Technik bringt jedoch die Schwierigkeit mit sich, komplexe Spektren auswerten zu müssen. Ein typisches energiedispersives Röntgenspektrum vom Kern einer proximalen Tubuluszelle zeigt Abb. 8A. Die $K\beta$ -Linie von K und die $K\alpha$ -Linie von Ca verschmelzen zu einer Linie. Die Linien von Na und Mg sind nur schwer vom Untergrund zu unterscheiden. Ebenso ist die exakte Abgrenzung der Linien von Si, P, S und Cl voneinander und vom Untergrund nur schwer möglich. Um eine Analyse dieser Spektren zu beschleunigen und um durch die Anwendung eindeutiger und einheitlicher Kriterien eine exakte und reproduzierbare Auswertung zu ermöglichen, wurde ein Computerprogramm entwickelt. Das Ergebnis dieser Computeranalyse zeigt Abb. 8B. Die durchgehenden glatten Kurven stellen den Untergrund und darauf die vom Programm berechneten charakteristischen Linien dar. Mithilfe des Programms wird das Spektrum ausreichend exakt beschrieben, so daß eine Auswertung möglich ist.

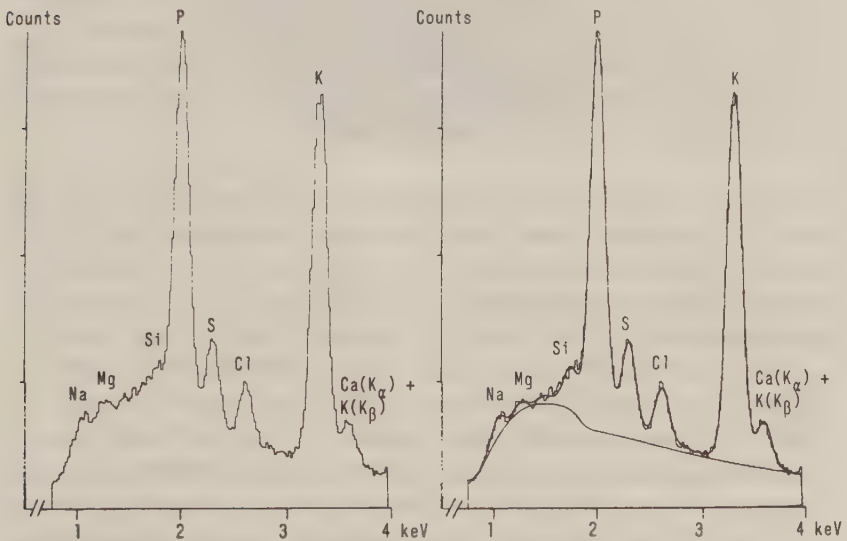


Abb. 8: Röntgenspektrum (EDA) einer Tubuluszelle

A: Histogramm des Originalspektrums

B: Originalspektrum und berechnetes Spektrum mit Untergrund (glatte Kurven).

2.5 Analyse gefriergetrockneter Dünnschnitte

Beim Gefrier Trocknen im Vakuum von 10^{-4} T und etwa 200 K sublimiert das im Dünnschnitt vorhandene Eis. Die Elektrolyte fallen als sehr kleine Kristalle aus, die sich an benachbarten Matrixstrukturen niederschlagen. Soweit eine biologische Matrix mit Trockengewichtsanteilen von über 10% Feuchtgewicht vorhanden ist, kommt es zu keinen nachweisbaren Dislokationen. Dies beweist die Messung der Intensität der charakteristischen Linie von K, die von z.B. extrazellulär 200 Impulsen über eine Strecke von etwa 0.5 bis 0.7 μm auf einen intrazellulären Wert von etwa 5000 Impulsen ansteigt und diesen Wert innerhalb der gesamten Zelle (mit statistischen Schwankungen) beibehält /22/. Dagegen sind quantitative Messungen im Interstitium mit seinem sehr niedrigen Trockengewicht oder im Tubuluslumen, in dem eine Matrix ganz fehlt, nicht möglich. Es bilden sich sehr viel größere Elektrolytkristalle, die aus einem Lösungsvolumen von mehreren μm^3 stammen können. Außerdem sind die Dislokationen ganz erheblich, da diese Kristalle beim Gefrier-trocknen zu Matrixstrukturen wandern können, die einige μm entfernt sind. Im elektronenmikroskopischen Bild werden diese Kristalle dann an der lumenseitigen Zellmembran gefunden, während das Tubuluslumen selbst leer erscheint.

Abb. 9 gibt vergrößert einen Ausschnitt aus der Zellwand eines proximalen Tubulus wieder. Dieser Schnitt wurde an verschiedenen Stellen bestrahlt, wie die Rasterfelder A bis E zeigen. Die darin aufgenommenen Röntgenspektren sind daneben dargestellt. Im Kern E und im Cytoplasma D werden annähernd gleiche Spektren mit typisch intrazellulärem Muster gemessen, die Intensitäten von K sind hoch, die von Na und Cl niedrig. Von dem Lumenkristall A wird dagegen ein fast reines extrazelluläres Spektrum mit sehr hohem NaCl-Gehalt gemessen, wie es der Elektrolytzusammensetzung der Flüssigkeit im proximalen Tubulus entspricht.

Beim Vergleich der einzelnen Linienhöhen muß die energieabhängige Anregungswahrscheinlichkeit und Absorption der Röntgenquanten und die Änderung der Linienbreite berücksichtigt werden. Von Elektronen mit 15 keV Energie wird die Cl-Linie um über 50% stärker angeregt als die Na-Linie. Außerdem werden die Röntgenquanten der charakteristischen Linie von Na

zu mehr als 50% vom Be-Fenster absorbiert, während die Absorption der Cl-Linie weniger als 10% beträgt. Soll darum z.B. aus dem Verhältnis der Na- und der Cl-Linie auf das Verhältnis der Elektrolytkonzentrationen am Ort der Messung geschlossen werden, muß die Höhe der Na-Linie mit einem Faktor von etwa 2.6 bis 3.0 multipliziert werden.

Unter der Annahme, daß der K-Peak der Spektren D und E einer intrazellulären K-Konzentration von etwa 120 bis 140 mM entspricht, ergeben sich an diesen Meßstellen Na- und Cl-Konzentrationen von 15 - 20 bzw. 30 - 40 mM. Auch das Spektrum A von dem Lumenkristall im Bürstensaum wurde unter

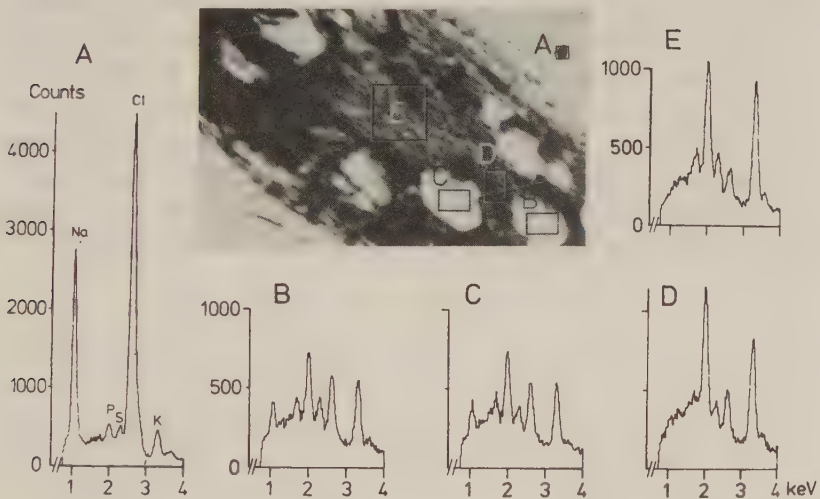


Abb. 9: Ausschnitt aus der Wand eines proximalen Tubulus mit eingezeichneten Meßpositionen (Rasterfeldern) und den dazu gehörenden Röntgenspektren (Bildausschnitt ca. $11 \times 7 \mu\text{m}$).

A: Kristall im luminalen Bürstensaum,

B und C: Vakuolen im Cytosol,

D: Cytosol,

E: Nucleus.

denselben Bedingungen mit gleichem Probenstrom und gleicher Meßzeit wie die Spektren D und E aufgenommen. Die Intensitäten der Na- und der Cl-Linie sind jedoch 4- bzw. 6-fach höher, als die der K-Linie der Spektren D und E. Bei dieser Messung wurde also eine entsprechend größere Menge von Elektrolyten angeregt, als bei den Messungen D und E. Aus dem Spektrum A kann jedoch nicht mehr die Elektrolytkonzentration der Tubulusflüssigkeit vor dem Gefriertrocknen berechnet werden, da sich, wie oben erwähnt wurde, im matrixarmen Bürstensaum und im matrixfreien Tubuluslumen Kristalle aus einem sehr großen Lösungsraum bilden können, dessen Volumen nicht genau bekannt ist.

Die Spektren B und C wurden von Messungen in intrazellulären Vakuolen erhalten. Die Linienintensitäten deuten darauf hin, daß die Vakuolenflüssigkeit einen Übergangszustand zwischen extra- und intrazellulärer Elektrolytzusammensetzung aufweist. Wegen der geringen Größe der Vakuolen und damit der Rasterfelder (etwa $0.5 \times 1 \mu\text{m}$) können bei der Messung auch die benachbarten intrazellulären Strukturen angeregt werden. Das Ausmaß dieser Anregung ist nicht genau abzuschätzen. Es wäre darum möglich, daß die Vakuolenflüssigkeit einen rein extrazellulären Elektrolytgehalt besitzt, und die gemessenen Spektren nur ein Gemisch von Anregungen dieser extra- und der benachbarten intrazellulären Kompartimente darstellen.

3 Computerprogramm

Die Analyse von Röntgenspektren ist in höheren Energiebereichen ab einigen keV einfach durchführbar. Abb. 10 zeigt ein Röntgenspektrum von 0 bis 17 keV. Ab etwa 3 keV ist der Untergrund nur leicht gekrümmt und kann stückweise durch eine Gerade beschrieben werden. Da die Linien in diesem Energiebereich zumeist gut voneinander getrennt sind, kann ihre Intensität ohne Schwierigkeiten berechnet werden. Problematisch wird eine Analyse im Bereich unterhalb von 3 keV, in dem die meisten Linien der biologisch relevanten Elektrolyte liegen. Wegen der Überlappung der Linien und insbesondere wegen der unregelmäßigen Krümmung des Untergrundes können kleine Linienintensitäten mit einfachen Verfahren wie linearer Interpolation oder Fourieranalyse nicht mehr genügend genau berechnet werden. Die exakte Berechnung auch kleiner Linienintensitäten ist jedoch die grundlegende Voraussetzung für eine quantitative Analyse.

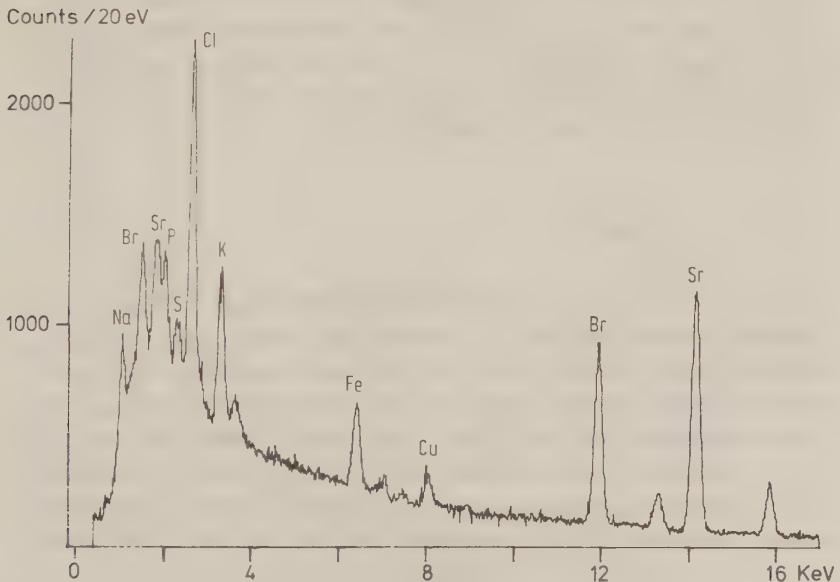


Abb. 10: Energiedispersives Röntgenspektrum von 0 bis 17 keV.

Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurde ein Computerprogramm entwickelt. Das Prinzip des Programms besteht darin, ein Röntgenspektrum als Linearkombination von (verbreiterten) Linien und einem Untergrund anzusehen. An jedes gemessene Spektrum wird ein künstlich erzeugtes Spektrum angepaßt, das aus berechneten Linien und berechnetem Untergrund zusammengesetzt ist. Die Form der künstlichen Spektrenanteile ist durch die physikalischen Grundlagen der Anregung von Röntgenstrahlen, der Absorptionseffekte innerhalb der Probe und im Detektor und den Vorgängen beim Nachweis im Detektor und Analysator vorgegeben.

Das Computerprogramm dient also nur der Auswertung von Röntgenspektren, indem es Untergrund und Linienintensitäten klar trennt. Die Quantifizierung, d.h. die Berechnung der Elementkonzentrationen aus den Linienintensitäten, wird mithilfe geeigneter Standards durchgeführt, wie in Teil 5 gezeigt wird.

Die für die Quantifizierung notwendigen Voraussetzungen werden in Teil 4 diskutiert. Eine dieser Voraussetzungen ist die Analyse dünner Proben, d.h. die Verwendung von etwa 1 µm dicken Dünnschnitten. Darum ist das Computerprogramm primär für die Analyse von Dünnschnitten entwickelt worden. Allerdings wäre eine Erweiterung für eine Analyse dickerer Schnitte ohne Schwierigkeiten möglich.

3.1 Das Primärspektrum

Aufgrund der in Teil 2.3 beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Elektronen und Probenatomen (Abb. 6) entsteht das ursprüngliche 'Primärspektrum', wie es Abb. 11 zeigt. Über dem kontinuierlichen Untergrund erheben sich die scharfen Linien der charakteristischen Strahlung. Die Energieabhängigkeit des Untergrundes wird am besten durch die Formel von A. Sommerfeld /52/ beschrieben. Für Röntgenquanten mit einer Energie E , die klein ist gegenüber der Anregungsenergie E_0 der Elektronen, kann man die sogenannte 1. Bornsche Näherung anwenden und erhält die Formel von Bethe und Heitler /7/ für die Bremsstrahlung $B(E)$

$$B(E) = \text{const} / (E \cdot E_0) \cdot \ln(\lambda(\sqrt{E_0} + \sqrt{E_0 - E})^2 / E) . \quad (1)$$

Da die Energie der Elektronen E_0 beim Durchdringen des Targets abnimmt, müßte exakt über alle in der Probe vorkommenden E_0 integriert werden. In unserer Versuchsanordnung macht jedoch der Energieverlust der mit 15 kV beschleunigten Elektronen bei der Passage durch die Probe nur 10 bis 15% aus. Wird darum in Gl. 1 statt E_0 der etwas kleinere Mittelwert $\bar{E}_0$ eingesetzt, dann kann die Form des Untergrundes mit Gl.1 genügend gut beschrieben werden.

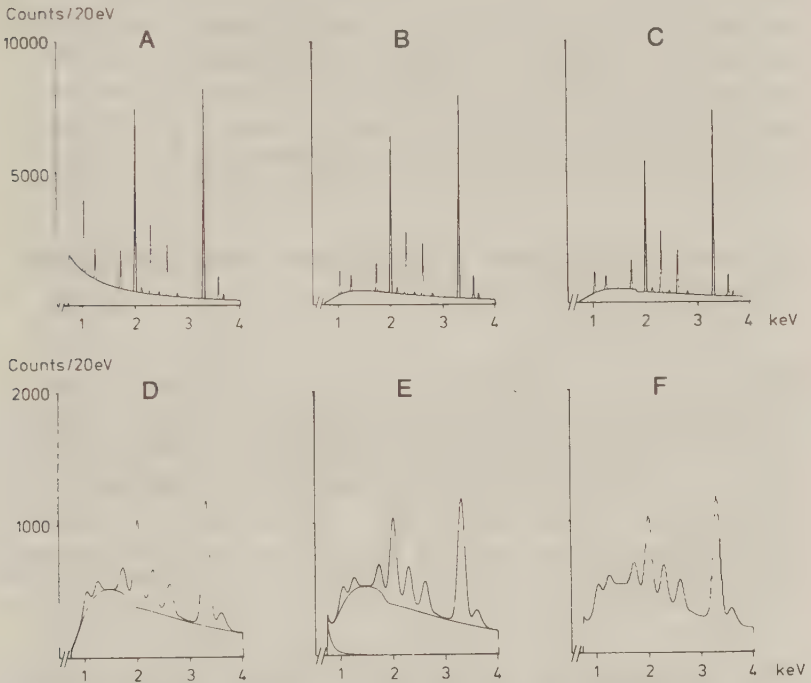


Abb. 11: Veränderung eines Röntgenspektrums im Verlauf der EDA

- A) Das in der Probe erzeugte 'Primärspektrum',
- B) nach Absorption im Be-Fenster,
- C) nach Absorption in der Si-Totschicht des Detektors.
- D) Das im Detektor erzeugte elektrische Impulshöhenspektrum,
- E) nach Beimischung gerätespezifischer Artefakte.
- F) Das endgültige Vielkanalspektrum.

3.2 Absorptionseffekte

Das Primärspektrum wird durch verschiedene, unterschiedlich stark ausgeprägte Absorptionseffekte verändert. Sie sind in der Probe selbst gering, sehr stark im Be-Fenster, vernachlässigbar klein in der oberflächlichen Goldschicht des Detektors und wieder ausgeprägt in der darauffolgenden Si-Totschicht. Hinter dem Be-Fenster hat das Spektrum das Aussehen wie in Abb. 11B. Besonders der niederenergetische Anteil des Spektrums unterhalb von 2 keV ist stark geschwächt. Einen weiteren wichtigen Absorber stellt die Totschicht des Si-Detektors dar. Unter anderem entsteht durch die Absorption in der Totschicht in dem zuvor glatten Untergrund bei der Ionisierungsenergie von Si $E_K = 1.839$ keV eine Stufe, da oberhalb E_K die Absorption von Si sprunghaft um einen Faktor 11 ansteigt.

Zur mathematischen Beschreibung der Absorptionseffekte wird die Transmissionsfunktion $T(E)$ benützt

$$T(E) = \exp (-\mu^* \cdot x) \quad . \quad (2)$$

$T(E)$ gibt an, welcher Bruchteil der ursprünglichen Röntgenstrahlung eine absorbierende Schicht der Dicke x durchdringt. μ^* , der lineare Absorptionskoeffizient des Absorbers, ist stark energieabhängig. Abb. 12 zeigt in einem doppelt logarithmischen Maßstab μ^* als Funktion der Röntgenenergie E für die Elemente Be, C, Si und Au. Aus der Linearität der Darstellung kann man entnehmen, daß $\mu^*(E)$ zumindest in dem angegebenen Energiebereich als

$$\mu_a^*(E) = m_a \cdot E^{-\delta_a} \quad (3)$$

beschrieben werden kann. Dabei gibt m_a den linearen Absorptionskoeffizienten des Absorbers a bei 1 keV und δ_a die Stärke der Energieabhängigkeit an. Für Si zeigt $\mu^*(E)$ bei der Energie $E_K = 1.839$ keV, der Ionisierungsenergie oder 'K-Absorptionskante', einen Sprung. Um diesen Sprung zu berücksichtigen, müssen ober- und unterhalb von E_K für m_{Si} und δ_{Si} zwei verschiedene Werte eingesetzt werden. Da Gold vier verschiedene M-Absorptionskanten besitzt, müssen in gleicher Weise fünf verschiedene Wertepaare für m_{Au} und δ_{Au} in den entsprechenden Energiebereichen gewählt werden. In Tab. 3 sind die Werte von m und δ aufgelistet, die sich aus Abb. 12 ergeben.

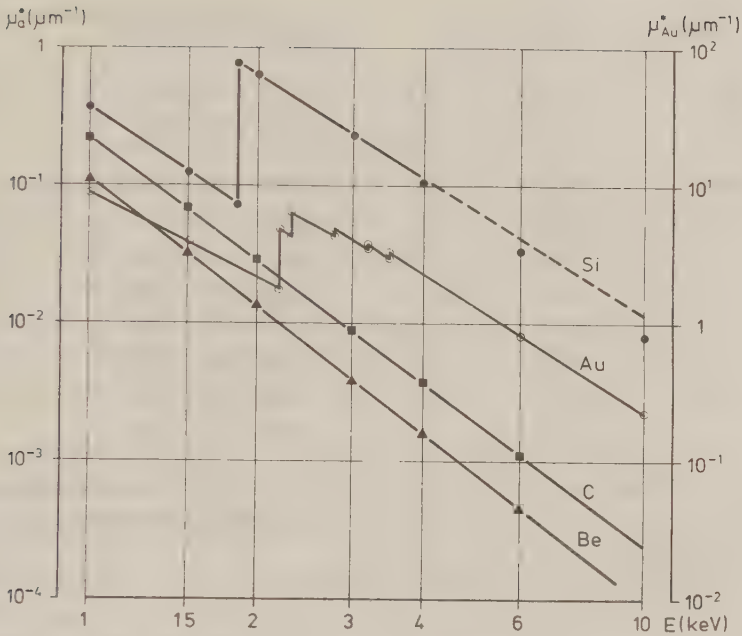


Abb. 12: Energieabhängigkeit des linearen Absorptionskoeffizienten $\mu^*(E)$ für die verschiedenen wichtigen Absorbermaterialien Be, C, Si und Au. (Die Daten sind einer Arbeit von Storm und Israel entnommen /53/).

Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete System von EDAX hatte wirksame Absorptionsschichten der Dicke $x_{\text{Be}} = 10 \mu\text{m}$, $x_{\text{Si}} = 0.22 \mu\text{m}$ und $x_{\text{Au}} = 0.01 \mu\text{m}$, die Daten des LINK-Systems waren $x_{\text{Be}} = 8.5 \mu\text{m}$, $x_{\text{Si}} = 0.18 \mu\text{m}$ und $x_{\text{Au}} = 0.01 \mu\text{m}$. Die Absorption einer Goldschicht von $0.01 \mu\text{m}$ Dicke beträgt bei Na weniger als 5% und kann darum vernachlässigt werden. Da die Absorptionscharakteristiken von C, dem hauptsächlichen Absorber der biologischen Probe, und von Be fast gleich sind, kann zur Vereinfachung im Computerprogramm eine mögliche Selbstabsorption innerhalb der Probe durch eine geringfügige Vergrößerung des Wertes von x_{Be} berücksichtigt werden.

Absorber a	$m_a (\mu\text{m}^{-1})$	δ_a	Energiebereich (keV)
Be	0.11	3.05	0.5 < E < 10.0
C	0.22	3.00	0.5 < E < 10.0
Si	0.36	2.64	0.5 < E < 1.839
	4.13	2.69	1.839 < E < 5.0
Au	8.86	2.05	0.5 < E < 2.206
	29.0	2.27	2.206 < E < 2.291
	44.4	2.33	2.291 < E < 2.743
	53.3	2.37	2.743 < E < 3.150
	58.5	2.40	3.150 < E < 3.425
	64.2	2.44	3.425 < E < 10.0

Tab. 3: Linearer Absorptionskoeffizient m_a für verschiedene Absorber a der Dicke 1 μm für Röntgenstrahlen von 1 keV Energie und Exponent δ_a der Energieabhängigkeit.

(Die Dichte von C wurde mit $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ eingesetzt).

Auswirkungen möglicher Inhomogenitäten des Absorbers können durch eine Erweiterung von Gl. 2 berücksichtigt werden. Unter der Annahme, daß die Dicke x eines Absorbers mit der Standardabweichung Δx variiert, erhält man die Transmissionsfunktion $T(E)$ als

$$T(E) = \exp (-\mu^* \cdot x + (\mu^* \cdot \Delta x)^2 / 2) . \quad (4)$$

Die Herleitung dieser Formel ist im Anhang gegeben. Für kleine Werte von Δx spielt dieser Korrekturterm nur bei Energien unter 1 keV eine Rolle. Unter Berücksichtigung der Inhomogenitäten in der Probe und im Be-Fenster ergeben sich in den zwei Energiebereichen ober- und unterhalb von E_K die folgenden vollständigen Transmissionsfunktionen

$$T(E < E_K) = \exp (-m_{\text{Be}} E^{-\delta_{\text{Be}}} x_{\text{Be}} + (m_{\text{Be}} E^{-\delta_{\text{Be}}} \Delta x)^2 / 2 - m_{\text{Si}1} E^{-\delta_{\text{Si}2}} x_{\text{Si}})$$

$$T(E > E_K) = \exp (-m_{\text{Be}} E^{-\delta_{\text{Be}}} x_{\text{Be}} + (m_{\text{Be}} E^{-\delta_{\text{Be}}} \Delta x)^2 / 2 - m_{\text{Si}2} E^{-\delta_{\text{Si}2}} x_{\text{Si}})$$

Gl. (5)

3.3 Nachweis von Röntgenstrahlen

Bei der energiedispersiven Analyse erzeugen Röntgenquanten in dem Si-Detektor Elektronen-Loch-Paare, deren Anzahl proportional zu ihrer Energie ist. Die freien Ladungsträger werden gesammelt, und es entsteht ein elektrischer Puls, der verstärkt wird. Bei all diesen Prozessen treten statistische Schwankungen auf, wodurch die zuvor scharfen Linien des Röntgenspektrums (Abb. 11C) zu stark erniedrigten und verbreiterten Peaks im Impulshöhenspektrum umgewandelt werden (Abb. 11D). Die Transformation des scharfen Röntgenspektrums in ein Impulshöhenspektrum bewirkt eine ähnliche Verschmierung, wie sie die Abbildung eines scharfen, kontrastreichen Bildes durch ein schlechtes optisches System ergibt.

Mathematisch kann dieser Vorgang durch die Abbildungsfunktion $L^*(E,e)$ beschrieben werden

$$L^*(E,e) = 1 / (\gamma \sqrt{\pi}) \exp \left(-\left(\frac{E-e}{\gamma} \right)^2 \right), \quad (6)$$

die aus der scharfen Linie der Energie E einen gaußförmig verwaschenen Peak erzeugt. Die Stärke der Verschmierung γ ist mit der Halbwertsbreite HB durch die Bedingung $HB = 2\gamma \sqrt{\ln(2)} = 1.665\gamma$ verknüpft.

In dem Energiebereich zwischen 1 und 4 keV hängt γ ungefähr gleich stark von statistischen Effekten bei der Entstehung der Ladungsträger und bei der Impulsverstärkung ab. Während der erste Beitrag die Energieabhängigkeit $\gamma = 2.355 \sqrt{F \cdot e \cdot E}$ besitzt, ist der zweite Beitrag systemabhängig. Zusammengefaßt ergibt sich für $\gamma(E)$ die Formel

$$\gamma(E) = (\gamma_0^2 + \gamma_E \cdot E)^{1/2}. \quad (7)$$

Abb. 13 zeigt Meßwerte und die Funktion $\gamma(E)$ für das EDAX-System (Punkte und Kurve 1) und das LINK-System (Rauten und Kurve 2). Aus diesen Funktionen errechnen sich die Werte für γ_0 und γ_E von 0.11 und 0.005 keV (EDAX) bzw. 0.07 und 0.003 keV (LINK).

Neben dieser symmetrischen Verschmierung gibt es auch noch Effekte, die zu einer asymmetrischen Verschmierung führen, die phänomenologisch als 'Fuß' auf der niederenergetischen Seite eines Gauß-Peaks imponieren. Dieser Effekt entsteht durch unvollständige Sammlung der Ladungsträger, dessen Ursache in 'trapping'-Phänomenen und in der Geometrie des

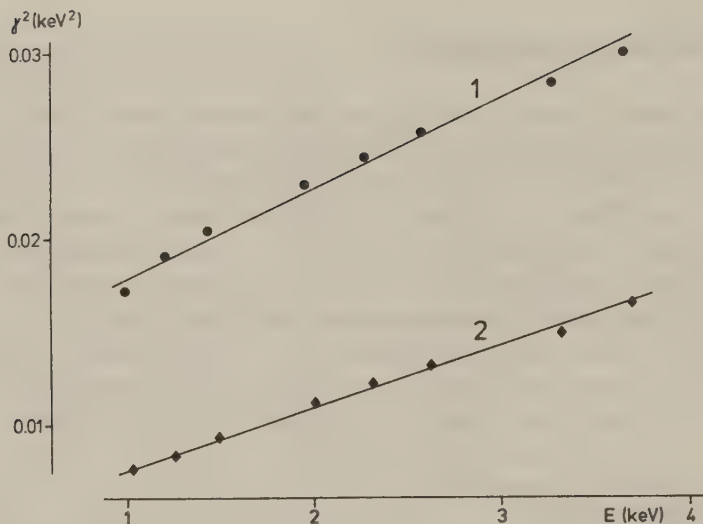


Abb. 13: Linienbreite γ des EDAX-Systems (1) und des LINK-Systems (2)

Detektors zu suchen ist. Das 'trapping'-Phänomen bedeutet, daß Fehlstellen des Kristalls angeregt werden, die ihre Energie erst nach einigen 10 - 100 μs abgeben. Dieser Energiebetrag fehlt dann dem erzeugten elektrischen Impuls. Wird ein Röntgenquant nahe der Totschicht oder der Randzone des Detektors absorbiert, dann können Ladungsträger in der Totschicht bzw. in der Randzone gebildet werden, wo sie nicht zum elektrischen Impuls beitragen. Durch beide Effekte wird also der erzeugte elektrische Impuls etwas verringert, und die Peaks erhalten ein asymmetrisches Aussehen.

Im Computerprogramm wird diese Linienform nachgeahmt, indem zu L^* eine zweite Gaußkurve der Breite γ_f addiert wird, die um den Betrag E_f zur niederenergetischen Seite verschoben ist. Damit hat die vollständige Abbildungsfunktion $L(E,e)$ die Form

$$L(E,e) = \frac{(1-f^*)}{\sqrt{\pi}\gamma(E)} \exp\left(-\frac{(E-e)^2}{\gamma(E)^2}\right) + \frac{f^*}{\sqrt{\pi}\gamma_f} \exp\left(-\frac{(E-E_f-e)^2}{\gamma_f^2}\right) \quad (8)$$

Die Werte von f , γ_f und E_f sind detektorabhängig. Für das EDAX- und das LINK-System ergaben sich Werte zwischen 0.01 und 0.05 für f^* je nach Energie der Linie, und E_f und γ_f wurden mit 120 bzw. 180 eV angepaßt.

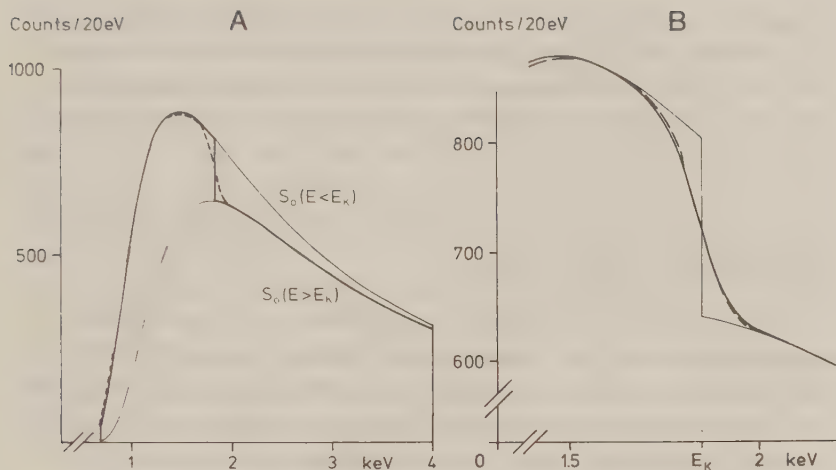


Abb. 14: Energieverteilung der Bremsstrahlung

- A) Die dicke durchgezogene Linie stellt das Röntgenspektrum $S_0(E)$ dar, das aus $S_0(E < E_K)$ und $S_0(E > E_K)$ in dem Energiebereich unterhalb und oberhalb E_K zusammengesetzt ist. Die gestrichelte Linie zeigt das elektrische Impulshöhenspektrum $S^*(E)$.
- B) Die Ausschnittvergrößerung zeigt das Impulshöhenspektrum $S^*(E)$ (gestrichelte Linie) und seine Approximation durch die Kurve $S(E)$ (dicke durchgezogene Linie) in dem Energiebereich um E_K .

Um aus einem Röntgenspektrum $S_0(E)$ ein elektrisches Impulshöhenspektrum $S^*(E)$ zu erhalten, muß man es mit der Abbildungsfunktion 'falten', d.h. integrieren. Abb. 14A zeigt für das Röntgenkontinuum sowohl $S_0(E)$ als auch $S^*(E)$. $S_0(E)$ besteht aus den zwei Funktionen

$$\begin{aligned} S_0(E < E_K) &= B(E) \cdot T(E < E_K) \quad \text{und} \\ S_0(E > E_K) &= B(E) \cdot T(E > E_K) \quad , \end{aligned} \quad (10)$$

die jeweils im entsprechenden Energiebereich eingesetzt werden müssen. $S_0(E)$ und $S^*(E)$ weichen im Bereich der Stufe bei E_K voneinander ab, während sie sonst fast gleich sind.

Es stellt sich das Problem, die beiden Funktionen $S_0(E)$ so miteinander zu verbinden, daß $S^*(E)$ im gesamten Energiebereich durch eine analytische, differenzierbare Funktion beschrieben werden kann. Diese Forderung kann z.B. mithilfe der Fermifunktion $F(E)$

$$F(E) = \left(1 + \exp\left(\frac{E-E_K}{g}\right) \right)^{-1} \quad (11)$$

erfüllt werden. Auf diese Weise erhält man die vollständig stetige und differenzierbare Funktion $S(E)$ als

$$S(E) = S_0(E < E_K) \cdot F(E) + S_0(E > E_K) \cdot (1-F(E)) \quad (12)$$

Wegen der Eigenschaft der Fermifunktion ($F(E \gg E_K) = 0$ und $F(E \ll E_K) = 1$) ist $S(E)$ für Energien entfernt von E_K mit $S_0(E)$ und damit auch mit $S^*(E)$ fast identisch. Wird außerdem noch die Breite der Fermifunktion g als $g = \sqrt{\pi} \gamma / 4 = 0.443 \gamma(E_K)$ gewählt, dann wird auch im Energiebereich um die Stufe eine fast perfekte Übereinstimmung zwischen $S(E)$ und $S^*(E)$ erreicht, wie es Abb. 14B veranschaulicht.

Für die charakteristischen Linien ist die mathematische Beschreibung der Transformation des Röntgenspektrums in das Impulshöhenspektrum relativ einfach. Wegen der Schärfe der Linien ergibt sich als 'Bild' der Linie i einfach die Abbildungsfunktion $L(E_i, E)$ bei der Linienenergie E_i . Dabei muß jedoch noch berücksichtigt werden, daß jedes Element i neben der $K\alpha$ -Linie die benachbarte $K\beta$ -Linie emittiert. Wegen der nahen Nachbarschaft beider Linien genügt es, nur einen Linienfuß zu berücksichtigen, und man erhält die Impulshöhenverteilung $P_i(E)$ der charakteristischen Linien des Elements i als

$$P_i(E) = H_i \cdot \left[\exp\left(-\left(\frac{E_{\alpha,i} - E}{\gamma(E_{\alpha,i})}\right)^2\right) + f_i \exp\left(-\left(\frac{E_{\alpha,i} - E_f - E}{\gamma_f}\right)^2\right) + b_i \exp\left(-\left(\frac{E_{\beta,i} - E}{\gamma(E_{\beta,i})}\right)^2\right) \right] \quad (13)$$

H_i beschreibt die Höhe der $K\alpha$ -Linie, b_i das Verzweungsverhältnis zwischen der $K\beta$ - und der $K\alpha$ -Linie. Die Werte von E_{α} , E_{β} und b_i sind für die Elemente Na bis Ca in Tab. 1 (Teil 2.3) aufgelistet. f_i ist mit f^* (Gl. 8) durch die Beziehung

$$f = f^* / (1 - f^*) \cdot \gamma(E) / \gamma_f \quad (14)$$

verknüpft.

Einen weiteren detektorabhängigen Effekt, der bei der mathematischen Beschreibung der Spektren in Betracht gezogen werden muß, stellt das Escape-Phänomen dar. Beim Nachweis der Röntgenstrahlen in einem Si-Detektor kann Si-K α -Strahlung entstehen und mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit den Detektor verlassen. Damit erzeugt jede Linie der Energie $E > E_K$ einen Escape-Peak bei der Energie $E - E_{\alpha, Si}$. Das Escape-Phänomen wird an zwei Spektren in Abb. 15 demonstriert. Die daraus berechneten Escape-Peaks besitzen 0.8 - 1.5% der Intensität der Linien. Durch Erweiterung von Gl. 13 um einen vierten Gauß-Peak könnte ein Escape-Peak berücksichtigt werden. In der vorliegenden Untersuchung war eine solche Anpassung jedoch nicht erforderlich, weil die Escape-Peaks wegen ihrer geringen Höhe und dem kleinen Peak-zu-Untergrund-Verhältnis in den Spektren nicht in Erscheinung traten. Bei Spektrenanalysen in einem Energiebereich unterhalb 0.7 keV könnte das Escape-Phänomen jedoch an Bedeutung gewinnen. In diesem Bereich ist die originale Bremsstrahlung um mehr als einen Faktor 40 durch Absorption geschwächt, so daß ein 'Escape-Untergrund' die Form des Kontinuums verändern könnte. Da unsere Analyse jedoch nur den Energiebereich ab 0.7 keV erfaßt, mußte das beschriebene Phänomen nicht berücksichtigt werden.

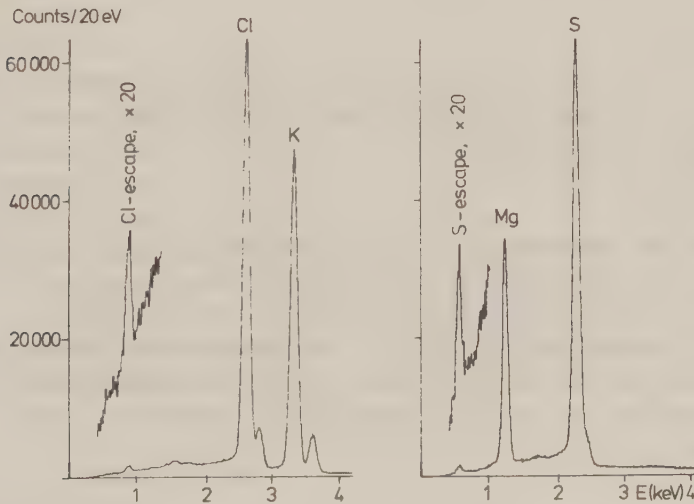


Abb. 15: Spektren von reinem KCl und $MgSO_4$. Die Escape-Peaks von Cl und S sind zusätzlich um einen Faktor 20 vergrößert dargestellt.

3.4 Impulshöhenanalyse

Die Implushöhenanalyse der elektrischen Impulse wird mit einem Vielkanalanalysator durchgeführt. Ein elektrischer Impuls der Energie E muß die Relation

$$(j-1) \cdot E_b < E < j \cdot E_b \quad (14)$$

erfüllen, um als Beitrag zum Kanalinhalt I_j des Kanals j addiert zu werden. E_b gibt die Kanalbreite an. Damit entsteht aus dem Impulshöhenspektrum der Abb. 11E das Histogramm des Vielkanalspektrums, Abb. 11F.

Verglichen mit der Kanalbreite E_b ändert sich die Intensität des Impulshöhenspektrums nur langsam. Darum genügt es, bei der Berechnung des künstlichen Spektrums die Intensität I_j bei der mittleren Energie E_j des Kanals j zu berechnen, statt in exakter Weise über den schmalen Energiebereich E_b zu integrieren. Werden zusätzlich noch kleine Nullpunktverschiebungen E_z und Verstärkungsänderungen des Vielkanalanalysators berücksichtigt, ergibt sich als mittlere Energie E_j des Kanals j der Wert

$$E_j = j \cdot E_w + E_z \quad (15)$$

Dabei stellt E_w in Gl. 15 nicht mehr eine feste Zahl dar, sondern einen gering veränderlichen Parameter, der durch seine Abweichung von der am Analysator eingestellten Kanalbreite E_b die Verstärkungsänderungen berücksichtigt.

Im Verlauf der Impulsverstärkung und der Vielkanalanalyse können Abweichungen von der exakten Linearität auftreten. Diese Nichtlinearitäten können für die nur schwach energieabhängige Bremsstrahlung vernachlässigt werden, aber sie sollten bei der Berechnung der charakteristischen Linien berücksichtigt werden. Das geschieht einfach durch Addition kleiner, variabler Energiebeträge e_i zu den bekannten, festen Energien $E_{\alpha,i}$ und $E_{\beta,i}$.

3.5 Gerätespezifische Einflüsse

Das gemessene Vielkanalspektrum setzt sich zum überwiegenden Teil aus Beiträgen zusammen, die von Röntgenstrahlen herrühren. Kleinere Beiträge zum Spektrum, die nicht von Röntgenstrahlen stammen, können durch rückgestreute Elektronen wie auch durch elektronisches Rauschen und Mikrofonieempfindlichkeit des Detektors zustande kommen.

Rückgestreute Elektronen können - wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit - das 8 bis 10 µm dicke Be-Fenster des Detektors durchdringen und dann im Si-Detektor wie ein Röntgenquant ein Signal proportional zu ihrer Energie erzeugen. Ein solcher Beitrag zum Röntgenspektrum ist dabei stark abhängig von der gewählten Beschleunigungsspannung und von der geometrischen Zuordnung von Detektor, Probe und letzter Aperturblende des Rasterelektronenmikroskops. Bei der von uns gewählten Beschleunigungsspannung von 15 kV werden solche von rückgestreuten Elektronen herrührende Effekte nur bei ungünstiger räumlicher Anordnung von Detektor und Probe beobachtet. Da sich diese Effekte außerdem nur in einem Energiebereich oberhalb 6 keV bemerkbar machen, brauchen sie bei der vorliegenden Analyse nicht besonders berücksichtigt zu werden.

Beiträge, die durch elektronisches Rauschen und Mikrofonieempfindlichkeit des Detektors hervorgerufen werden, können dagegen zur Ausbildung einer 'Zacke' im niederenergetischen Bereich des Spektrums führen (Abb. 11E). Bei dem neueren LINK-System waren diese Beiträge vernachlässigbar klein, wogegen sie bei dem älteren EDAX-System berücksichtigt werden mußten. Es zeigte sich, daß die 'Noise-Zacke' durch zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden kann

$$N(j) = \exp(N_1 + N_2 - j/(3N_3)) + \exp(N_1 - j/N_3) , \quad (16)$$

worin N_1 und N_2 die Höhen und N_3 die Energieabhängigkeit dieser artifiziellen Komponente angeben.

3.6 Mathematisches Anpassungsverfahren

Nach den vorangegangenen Ausführungen wird der Kanalinhalt I_j des künstlich erzeugten Spektrums durch drei Terme bedingt:

- 1) einen Noise-Term,
- 2) den Beitrag der Untergrundsstrahlung und
- 3) den Beitrag der charakteristischen Linien.

Zusammengefaßt ergibt sich für I_j die analytische Formel

$$\begin{aligned}
 I_j = & \exp(N_1 - \frac{j}{N_3}) + \exp(N_1 + N_2 - \frac{j}{3N_3}) \\
 & + \frac{\alpha}{E_j \cdot E_0} \ln [\lambda (\sqrt{E_0} + \sqrt{E_0 - E_j})^2 / E_j] \cdot \\
 & [(1 - F(E_j)) \exp(-4.13 x_{Si} E_j^{-2.69}) + F(E_j) \exp(-0.36 x_{Si} E_j^{-2.64})] \\
 & \cdot \exp(-0.11 x_{Be} E_j^{-3.05} + (0.11 \Delta x_{Be} E_j^{-3.05})^2 / 2) \\
 & + \sum_{i=1} H_i [\exp(-(\frac{E_{\alpha,i} + e_i - E_j}{\gamma(E_{\alpha,i})})^2) + b_i \exp(-(\frac{E_{\beta,i} + e_i - E_j}{\gamma(E_{\beta,i})})^2) \\
 & + f_i \exp(-(\frac{E_{\alpha,i} + e_i - E_f - E_j}{\gamma_f})^2)]
 \end{aligned} \tag{17}$$

mit $E_j = j E_w + E_z$, $\gamma(E) = (\gamma_0^2 + \gamma_E \cdot E)^{1/2}$ und

$$F(E) = [1 + \exp((E - E_K) / (0.443 \gamma(E_K)))]^{-1} .$$

Das durch I_j bestimmte künstliche Spektrum muß bei der Analyse an das gemessene Spektrum mit den Kanalgehalten C_j angepaßt werden. Als Gütekriterium für die Anpassung wird üblicherweise die Summe Z der gewichteten Abweichungsquadrate benützt

$$Z = \sum_j \frac{(I_j - C_j)^2}{C_j} \tag{18}$$

Der Gewichtungsfaktor $1/C_j$ ergibt sich aus dem Zählfehler des Kanals j , der nach den Regeln der Statistik gleich $(C_j)^{1/2}$ ist. Die Übereinstimmung zwischen gemessenem und künstlichem Spektrum ist dann optimal, wenn Z minimal wird und - im Idealfall - den Wert 1 annimmt.

Um Z zu minimalisieren, muß das n -dimensionale Gleichungssystem

$$\frac{\partial Z}{\partial p_1} = 0, \quad \frac{\partial Z}{\partial p_2} = 0 \quad \dots \quad \frac{\partial Z}{\partial p_n} = 0 \quad (19)$$

gelöst werden, wobei die Parameter p_1, p_2 usw. die Variablen H_i, α, N_1 usw. repräsentieren. Da dieses Gleichungssystem nicht-linear ist, verlangt die Lösung einen Iterationsprozeß. Zu diesem Zweck wurde ein modifiziertes Newton-Verfahren benutzt. Bei der Beschreibung des Iterationsverfahrens werden folgende Formeln und Abkürzungen verwendet:

Der Satz der n Parameter forme den Vektor $\vec{p}$

$$\vec{p} = (p_1, p_2 \quad \dots \quad p_n) . \quad (20)$$

Z kann dann als Funktion im n -dimensionalen Vektorraum $\vec{p}$ betrachtet werden. Die 1. Ableitung von Z (Gl. 18) nach $\vec{p}$ erzeugt den Vektor $\vec{Z}'$, dessen k -te Komponente durch

$$Z'_k = \frac{\partial Z}{\partial p_k} = 2 \sum_j \frac{I_j - C_j}{C_j} \frac{\partial I_j}{\partial p_k} \quad (21)$$

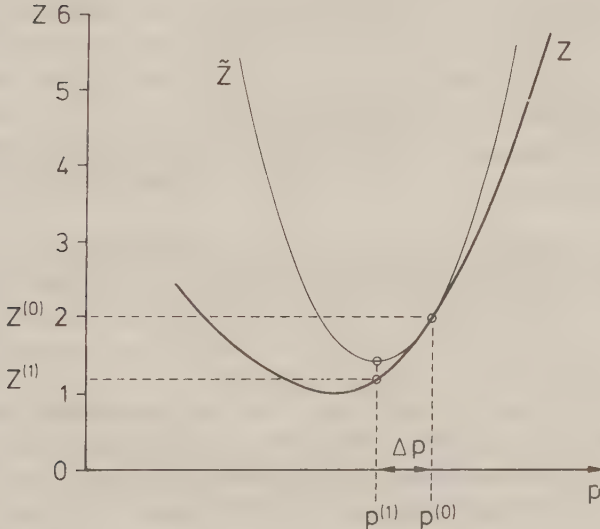


Abb. 16: Prinzip des Newton-Verfahrens zur Minimum-Bestimmung von $Z(p)$. Die Schmiegungsparabel $\tilde{Z}$ durch den Punkt $(p^{(0)}, Z^{(0)})$ bestimmt den Parameterwert $p^{(1)}$, der das Minimum von Z besser beschreibt.

gegeben wird. Die 2. Ableitungen von Z nach $\vec{p}$ ergeben die Matrix $\vec{Z}''$, deren k-tes und l-tes Element gegeben ist durch

$$Z''_{kl} = \frac{\partial^2 Z}{\partial p_k \partial p_l} = 2 \sum_j \frac{1}{C_j} \left(\frac{\partial^2 I_j}{\partial p_k \partial p_l} (I_j - C_j) + \frac{\partial I_j}{\partial p_k} \frac{\partial I_j}{\partial p_l} \right). \quad (22)$$

Abb. 16 zeigt das Newton-Verfahren für den 1-dimensionalen Fall (Z hängt nur von einem Parameter p ab). An jedem Punkt ($p^{(0)}$, $Z^{(0)}$) kann die Schmiegungsparabel konstruiert werden ($\tilde{Z}$), die nach Definition mit Z(p) im Funktionswert und in der 1. und 2. Ableitung übereinstimmt. Das Minimum von $\tilde{Z}$ bei $p^{(1)}$ wird durch $p^{(1)} = p^{(0)} - \Delta p$ gegeben. Analog erhält man im n-dimensionalen Fall einen neuen Parametersatz $\vec{p}^{(1)}$ durch

$$\vec{p}^{(1)} = \vec{p}^{(0)} - \Delta \vec{p}, \quad (23)$$

der einen kleineren Wert von Z liefern sollte. Der Vektor $\Delta \vec{p}$ stellt die Lösung des Gleichungssystems

$$\vec{Z}'' \Delta \vec{p} = -\vec{Z}', \quad \text{oder explizit}$$

$$Z''_{11} \Delta p_1 + Z''_{12} \Delta p_2 + \dots + Z''_{1n} \Delta p_n = -Z'_1 \quad (24)$$

$$Z''_{21} \Delta p_1 + Z''_{22} \Delta p_2 + \dots + Z''_{2n} \Delta p_n = -Z'_2$$

⋮

$$Z''_{n1} \Delta p_1 + Z''_{n2} \Delta p_2 + \dots + Z''_{nn} \Delta p_n = -Z'_n$$

dar. Dieses Gleichungssystem ist linear und kann mithilfe von Standardmethoden gelöst werden.

Für die Lösung des Gleichungssystems wurden zwei Modifikationen verwandt. Unter Vernachlässigung der 2. Ableitungen von I_j in Gl. 22 wird $\vec{Z}''$ durch

$$Z''_{kl} \approx 2 \sum_j \frac{1}{C_j} \frac{\partial I_j}{\partial p_k} \frac{\partial I_j}{\partial p_l} \quad (25)$$

approximiert. Durch diese Vereinfachung wird der Kernspeicherbedarf des Computerprogramms ganz entscheidend reduziert und die Berechnung erheblich beschleunigt. Außerdem werden die Matrixelemente mit dem Faktor U multipliziert, um den Iterationsprozeß zu stabilisieren. U ist als

$$U = \left(1 + \frac{u}{Z} \sum_k \frac{(Z'_k)^2}{Z''_{kk}} \right) \quad (26)$$

definiert, wobei die Zahl u zwischen 0 und 10 variiert und die Iteration mit zunehmender Größe stabilisiert.

3.7 Beschreibung des weiteren Computerprogramms

In dem beschriebenen Iterationsprozeß müssen immer 12 bis 14 Parameter angepaßt werden. Neben den Höhen H_i der 8 bis 10 charakteristischen Linien sind dies die Höhe des Untergrundes α , die Höhe der Noise-Zacke N_1 , die Stärke der Absorption x_{Be} (die die Absorption innerhalb der Probe mit einschließt) und λ , das ebenfalls probenspezifisch die Form des Untergrundes mit beeinflußt. Außerdem werden auch noch γ_0 , E_w und E_z angepaßt, die die Linienbreite und die Eichung des Analysators beschreiben. Die Anpassung dieser weiteren 3 Parameter ist zweckmäßig, da sie sich alle während eines längeren Betriebs geringfügig verändern können. Als Startwerte werden für die meisten Parameter die Werte übernommen, die als Ergebnis der letzten Rechnung gefunden wurden. Für die Höhen der Linien, des Untergrundes und der Noise-Zacke werden dagegen grobe Schätzwerte aus dem jeweils aktuell vorliegenden Spektrum ermittelt. Zu diesem Zweck werden von dem Programm im Energiebereich von 3 keV, der frei von störenden charakteristischen Linien ist, zuerst der Untergrundwert α festgelegt. Dann wird die Höhe der Zacke N_1 aus den ersten Kanalinhalten des Spektrums berechnet (soweit mit dem EDAX-System gearbeitet wurde). Durch Subtraktion des so gewonnenen 'Untergrundes' vom Originalspektrum bleibt in etwa ein Linienspektrum übrig, aus dem das Programm Startwerte für die Höhen der charakteristischen Linien bestimmen kann.

Die gesamte Programmstruktur ist in Abb. 17 als Flußdiagramm gezeigt. Zu Beginn eines jeden Programmdurchlaufs kann der Benutzer diejenigen Parameter festlegen, die im Fit angepaßt werden sollen. Dann wird ein neues Spektrum vom Analysator eingelesen oder ein schon gespeichertes Spektrum zu einer neuen Berechnung von dem externen Speicher (Platte) gelesen. Nach der Berechnung der Startwerte wird die Summe der Abweichungsquadrate Z und die 1. und 2. Ableitungen $\vec{Z}'$ und $\vec{Z}''$ berechnet, und die Diagonalelemente Z''_{kk} werden mit dem Stabilisierungsfaktor U multipliziert. Aus der Lösung der Gleichung $\vec{Z}'' \Delta \vec{p} = \vec{Z}'$ wird $\Delta \vec{p}$ und damit der neue Parametersatz $\vec{p}^{(1)}$ bzw. in der $(m+1)$ ten Iteration der Parametersatz $\vec{p}^{(m+1)}$ bestimmt. Wenn der neue Wert $Z^{(m+1)}$ kleiner ist als der alte Wert $Z^{(m)}$, wird der neue Parametersatz übernommen und ein neuer Iterationsprozeß gestartet. Andernfalls wird U vergrößert und

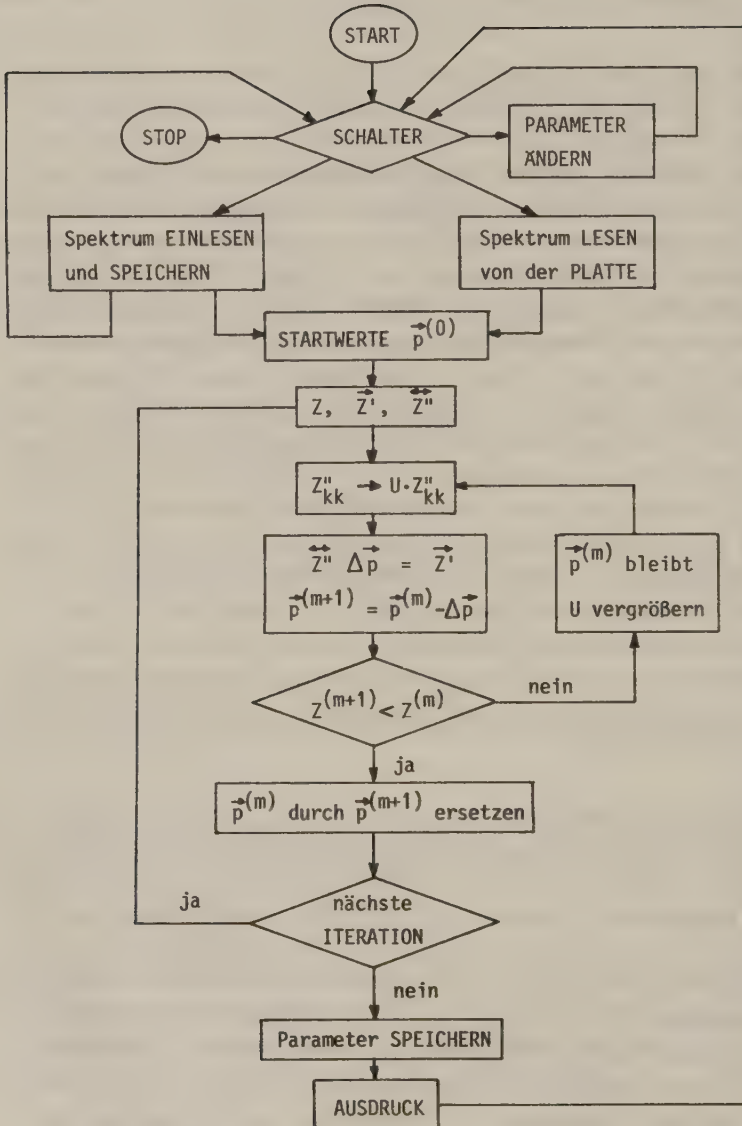


Abb. 17: Flußdiagramm des Computerprogramms

$\vec{p}^{(m+1)}$ erneut berechnet. Wenn eine vorgegebene Zahl von Iterationen erreicht ist, oder wenn die erzielte Verbesserung kleiner ist als ein vorgegebener Wert, wird der Iterationsprozeß beendet.

Das Ergebnis mehrere aufeinanderfolgender Iterationen wird in Abb. 18 wiedergegeben. Das Histogramm zeigt jeweils dasselbe gemessene Spektrum, das in einem gefriergetrockneten Dünnschnitt einer Froschhautepithelzelle aufgenommen wurde. Die durchgezogenen Kurven geben den angepaßten Verlauf des Spektrums, die Untergrundkurve und die Noise-Zacke wieder.

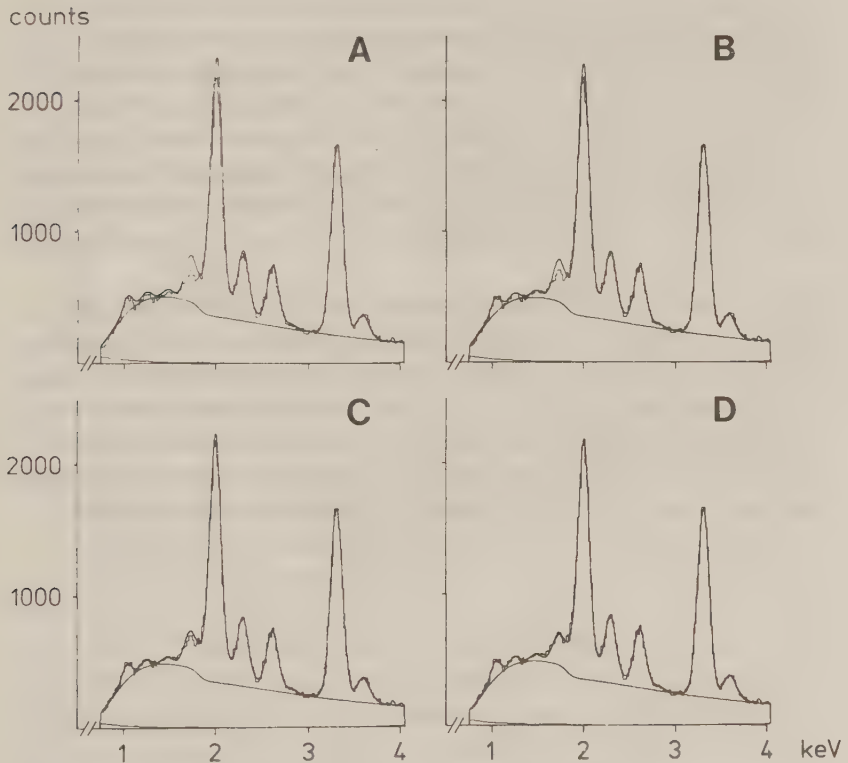


Abb. 18: Gemessenes Spektrum (Histogramm) und künstlich erzeugtes Spektrum (glatte Kurven). Zunehmende Übereinstimmung nach der Bestimmung der Startwerte (A) und nach 1 (B), 2 (C) und 4 (D) Iterationen.

Nach der Bestimmung der Startwerte (Abb. 18A) ist die Übereinstimmung zwischen dem gemessenen und dem angepaßten Spektrum nur sehr grob, der zugehörige Wert von Z , der Summe der Abweichungsquadrate, beträgt 3.24. Nach einer (Abb. 18B), zwei (C) und vier (D) Iterationen wird die Übereinstimmung schnell besser, die entsprechenden Werte von Z lauten 1.95, 1.32 und 1.03. Damit ist nach vier Iterationen eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen gemessenem und berechnetem Spektrum erreicht.

Das Rechenprogramm ist in FORTRAN geschrieben. Oblicherweise werden 170 Kanäle mit 20 eV Kanalbreite im Energiebereich von 0.6 bis 4 keV ausgewertet. Bei 4 bis 5 Iterationen, mit denen, wie oben gezeigt wurde, eine ausreichend gute Anpassung erzielt werden kann, wird an einem PDP 12 -Computer mit Hochgeschwindigkeitsgleitkommarechenwerk (FPP) die Auswertung eines Spektrums innerhalb von 3 bis 4 Minuten durchgeführt. Davon entfallen auf die reine Rechenzeit jedoch nur ungefähr zwei Minuten, der Rest der Exekutionszeit wird für Datentransfer zwischen dem relativ kleinen Kernspeicher mit 8 k byte und einem peripheren Speicher (Platte) verbraucht.

Da die gesamte Rechenzeit in etwa der Meßzeit von 200 bis 400 s entspricht, steht somit nach jeder Messung das Ergebnis der vorangegangenen Analyse zur Verfügung, wodurch eine sehr effiziente Kontrolle der laufenden Analyse möglich wird. Fast ohne Zeitverzögerung können z.B. Präparationsartefakte erkannt und die Analyse eines solchen Schnittes beendet werden. Ebenfalls wird die Entscheidung, ob in einem bestimmten Gewebeareal weitere Messungen durchgeführt werden sollen, durch das vorliegende Ergebnis der vorangegangenen Messung sehr erleichtert.

4 Voraussetzungen der quantitativen Analyse

Die quantitative Analyse von Elektrolyten in biologischem Weichgewebe setzt eine Präparation voraus, die die in vivo-Verteilung der diffusiblen Ionen erhält. Dies ist mit der Technik des Schockgefrierens und Gefrierschneidens gewährleistet, wie in Arbeiten von A. Dörge et al. / 19, 20, 21, 22 / gezeigt wurde, und soll hier nicht weiter diskutiert werden. Der Nachweis geringer Elementkonzentrationen erfordert eine exakte Trennung auch kleiner Linienintensitäten vom Untergrund. Diese Trennung leistet zuverlässig das beschriebene Computerprogramm.

Aus den gemessenen Linienintensitäten müssen die biologisch relevanten Elementkonzentrationen berechnet werden, die am Ort der Messung vorliegen. Diese Quantifizierung wird sehr vereinfacht, wenn Dünnschnitte analysiert werden. Auch die Größe der Beschleunigungsspannung, die innerhalb bestimmter Grenzen für die gewählte Schnittdicke optimiert werden kann, beeinflusst die Analyse. Weiterhin dürfen bestimmte äußere Parameter während einer Analyse nicht variiert werden, wenn eine exakte Quantifizierung durchgeführt werden soll.

Eine weitere Voraussetzung für die Quantifizierung ist die lokale Homogenität der Probe. Inhomogenitäten können sich bei schlechter Einfrieretechnik, in zu großer Entfernung von der Einfrieroberfläche und in Gewebe mit einem Trockengewichtsanteil (TG) von weniger als 10-15% Feuchtgewicht (FG) bilden. Diese Inhomogenitäten beeinträchtigen die Quantifizierung und können besonders in dicken Schnitten von mehr als 2 bis 3 μm Dicke zu falschen Ergebnissen führen.

Wird jedoch die Probe adäquat eingefroren und werden nur Strukturen mit genügend hohem TG untersucht, dann erlaubt die EMA eine zuverlässige, reproduzierbare Messung. Die aus den Spektren erhaltenen Linienintensitäten verhalten sich über einen Bereich von mehr als zwei Dekaden linear zu den Elementkonzentrationen, die am Ort der Messung vorliegen, und ermöglichen somit in dem gesamten physiologisch vorkommenden Konzentrationsbereich eine exakte Quantifizierung.

4.1 Verwendung von Dünnschnitten

Die Wahl der Schnittdicke stellt einen Kompromiß dar, der verschiedenen, zum Teil gegensätzlichen Forderungen Rechnung trägt. Eine obere Abgrenzung ergibt sich aus der Histologie des untersuchten Gewebes. Die Schnittdicke sollte deutlich kleiner sein als die Größe der Zelldurchmesser von 8 bis 10 μm , da sonst bei der Analyse neben intra- auch extrazelluläre Räume angeregt würden. Umgekehrt begrenzt die Eiskristallbildung die minimale Schnittdicke. Die Größe der Eiskristalle im schockgefrorenen Gewebe liegt zwischen 50 und 200 nm und nimmt mit zunehmender Entfernung von der Einfrieroberfläche noch zu. Schnitte unter 0.1 μm , die technisch nur sehr schwierig herzustellen wären, lägen nach dem Gefriertrocknen als sehr inhomogenes Material mit sehr großen Löchern und daneben entsprechenden Matrixverdichtungen vor, was zu Problemen bei der Quantifizierung führen könnte (vergl. Teil 4.3).

Die Zahl der in einem Schnitt erzeugten Röntgenquanten ist bis hin zu einigen μm der Schnittdicke ungefähr proportional. Darum ist es günstig, möglichst dicke Schnitte zu messen, da Ergebnisse gleicher statistischer Aussagekraft schon nach entsprechend kürzerer Meßzeit erhalten werden. Außerdem gibt es in einem Röntgenspektrum unspezifische Anteile, die nicht vom Probenmaterial, sondern von der Umgebung stammen. Diese Beiträge können von Röntgenstrahlen herrühren, die in den beiden Folien von zusammen etwa 50 nm Dicke erzeugt werden, von Röntgenstrahlen, die in der Meßkammer des Rasterelektronenmikroskops oder in dem Ni-Grid angeregt werden und das Be-Fenster des Detektors durchdringen (vergl. Teil 4.2). Diese unspezifischen Beiträge sind weitgehend unabhängig von der Schnittdicke, nehmen also mit zunehmender Schnittdicke relativ zum probenspezifischen Spektrum ab.

Die Quantifizierung wird wesentlich vereinfacht, wenn das Meßsystem linear arbeitet, d.h. wenn die Intensität der charakteristischen Linien direkt proportional dem Elementgehalt im angeregten Probenvolumen ist. Diese Linearität liegt nur vor, wenn die Abbremsung der Elektronen gering und damit die Anregungsenergie E_0 für Röntgenstrahlen im gesamten Probenvolumen in etwa gleich ist, und wenn weiterhin die Röntgenstrahlen

in der Probe selbst nicht wesentlich absorbiert werden. Sind beide Voraussetzungen erfüllt, dann kann die Probe im Sinn der EMA als 'dünn' angesehen werden.

Um die Selbstabsorption der Röntgenstrahlen in der Probe möglichst gering zu halten, wird die Schnittdicke auf deutlich kleinere Werte als die oben genannten 8 bis 10 μm begrenzt. Mit zunehmender Schnittdicke nimmt die Selbstabsorption besonders von niederenergetischen Röntgenquanten in der Probe stark zu, wie Tab. 4 zeigt. Ein 2 μm dicker gefriergetrockneter Schnitt (C, $\rho = 0.25$) schwächt das Röntgensignal ungefähr so stark ab wie eine 1 μm dicke Be-Schicht. Unter der Voraussetzung, daß die Röntgenquanten in allen Schichten eines Schnitts mit gleicher Wahrscheinlichkeit entstehen, ergibt sich eine mittlere absorptiv wirksame Schichtdicke von nur 1 μm . Diese Schicht absorbiert das Na-Signal um etwa 5%, ein Betrag, der vernachlässigt werden kann. (In einer exakten Berechnung der Selbstabsorption müßte über die Schichtdicke integriert werden. Wie im Anhang gezeigt wird, liegt der Fehler, der durch die vorgenommene Vereinfachung erkauft wird, unter 0.1%).

Absorber	Element		(BS)	Na	P	Cl	K
	E_{α} (keV)		0.7	1.041	2.013	2.621	3.311
	Dichte	x (μm)					
Be	1.86	1.0	0.721	0.907	0.987	0.994	0.997
		10.0	0.038	0.377	0.874	0.941	0.970
C	0.25	1.0	0.852	0.952	0.993	0.997	0.998
		2.0	0.726	0.906	0.986	0.994	0.997
		5.0	0.449	0.784	0.967	0.985	0.992
O (H_2O)	1.00	0.5	0.646	0.815	0.970	0.986	0.993
		2.0	0.174	0.441	0.885	0.944	0.971
Si	2.33	0.25	0.794	0.922	0.854	0.925	0.959

Tab. 4: Transmission von Röntgenstrahlen verschiedener Energie in verschiedenen Absorbern unterschiedlicher Schichtdicke. 'BS' bedeutet Bremsstrahlung. Die Dichte von C mit $0.25 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ entspricht dem Trockengewicht der Matrix von biologischem Gewebe.

Das Ausmaß der Abbremsung von Elektronen in einem Schnitt zeigt Abb. 19, die in einem doppelt logarithmischen Maßstab die Eindringtiefe von Elektronen in Materialien verschiedener Dichte wiedergibt. Die gestrichelte Linie mit $\rho = 0.25$ gilt für gefriergetrocknete Schnitte. Wie im nächsten Teil gezeigt wird, ist eine Anregungsenergie E_0 der Elektronen zwischen 12 und 20 keV optimal. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Beschleunigungsspannung von 15 kV verwandt. Wie aus Abb. 19 hervorgeht, werden in einem $1\text{ }\mu\text{m}$ dicken Schnitt Elektronen von 15 keV auf etwa 13 keV abgebremst, sie besitzen also eine mittlere Anregungsenergie von 14 keV mit einer Energieunschärfe von $\pm 1\text{ keV}$. Diese Energieunschärfe beeinträchtigt die quantitative Analyse nicht, wie im folgenden Teil und im Anhang gezeigt wird.

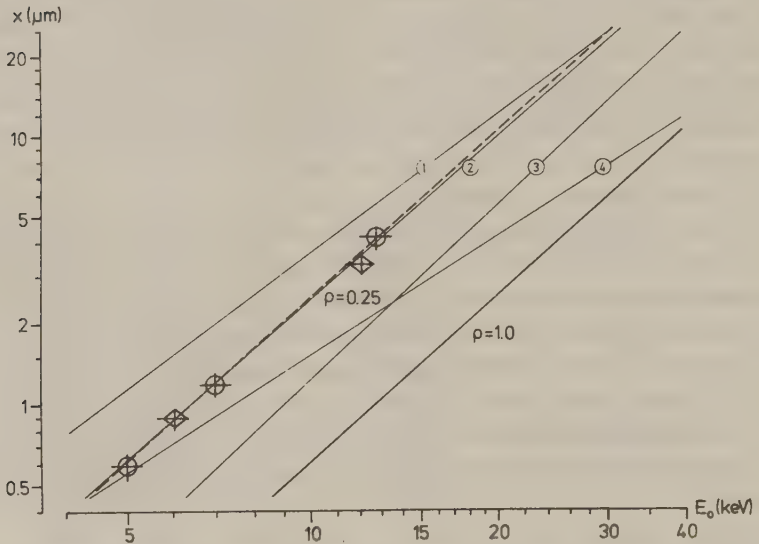


Abb. 19: Eindringtiefe von Elektronen in Material verschiedener Dichte. Die eingezeichneten Meßpunkte und die daraus gewonnene gestrichelte Linie gelten für $\rho = 0.25$, die durchgezogenen Linien für $\rho = 1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Die Meßdaten wurden von Standardschnitten erhalten, deren Dicke mit dem Serienschneidverfahren (vergl. Teil 5.4) genau ermittelt wurde. Die dünnen Linien 1 bis 4 stellen theoretisch berechnete Eindringtiefen der Autoren Castaing /11/, Duncumb /23/, Reed /45/ und Andersen /1/ dar.

4.2 Wahl der Beschleunigungsspannung

Die Größe der Beschleunigungsspannung beeinflusst die Form des Röntgenuntergrundes und das Intensitätsverhältnis der verschiedenen charakteristischen Linien. Die richtige Wahl der Anregungsenergie E_0 der Elektronen und ihre Konstanz während der Messung stellt darum eine wesentliche Voraussetzung für eine quantitative Analyse dar. Den Einfluß von E_0 auf das gemessene Röntgenspektrum zeigt qualitativ Abb. 20. Derselbe etwa 1 μm dicke, gefrieretrocknete Schnitt einer 25% Albuminlösung mit bestimmtem Elektrolytgehalt wurde mit Elektronen von 20, 15, 11 und 8 keV Anregungsenergie bestrahlt. In dem 20 keV-Spektrum fällt ein breiter Buckel im Bereich von 6 bis 11 keV auf, der in den anderen Spektren nicht zu sehen ist. Diesen Buckel erzeugen rückgestreute Elektronen, die mit zunehmender Anregungsenergie größere Energie besitzen und darum mit größerer Wahrscheinlichkeit das Be-Fenster des Detektors durchdrin-

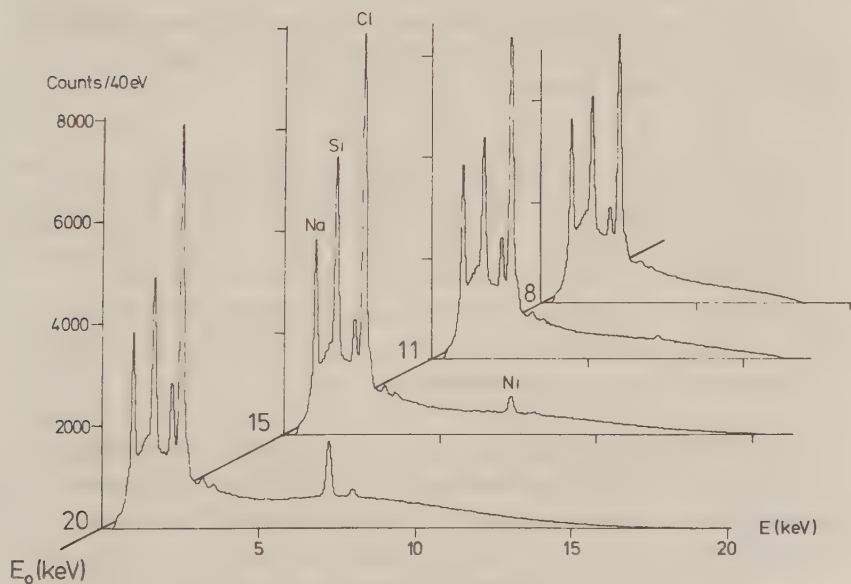


Abb. 20: Spektren eines Standard-Albuminschnitts, gemessen mit verschiedenen Anregungsenergien E_0 .

gen können. Gleichzeitig wird das Ni-Grid verstärkt von höherenergetischen Elektronen getroffen, was die deutlich prominente $K\alpha$ -Linie von Ni beweist. Die Anregung von Ni ist insofern ungünstig, als Ni bei 0.85 keV die $L\alpha$ -Linie emittiert. Dadurch wird die genaue Bestimmung des Untergrunds vor der Na-Linie erschwert und die Bestimmung kleiner Na-Konzentrationen etwas ungenauer. Diese beiden Nebeneffekte beeinträchtigen also eine Analyse bei höheren Anregungsspannungen.

Beim Vergleich des 8 keV-Spektrums mit den übrigen Spektren fällt die Abnahme des Cl-Signals gegenüber dem Untergrund und den übrigen Linien auf. Der Einfluß von E_0 auf die Form der Spektren kann quantitativ aus den Formeln für die Anregungswahrscheinlichkeit von Röntgenquanten hergeleitet werden. Für die Ionisierungswahrscheinlichkeit $s_c(E_i, E_0)$ von Energieniveaus der Energie E_i in Atomen durch Elektronen mit der Energie E_0 gilt die Formel von Bethe / 6 /

$$s_c(E_i, E_0) = \text{const} / (E_0 \cdot E_i) \cdot \ln(E_0/E_i) \quad (27)$$

Die Anregungswahrscheinlichkeit von Bremsstrahlen $s(E, E_0, \lambda)$ wird für Quantenenergien $E \ll E_0$ durch die Formel von Bethe und Heitler / 7 / (Gl. 1) beschrieben, die für $E \ll E_0$ übergeht in

$$s(E, E_0, \lambda) = \text{const} / (E_0 \cdot E) \cdot \ln(2\lambda \cdot E_0/E) \quad (28)$$

Der Zahlenwert von λ kann aus der Theorie nicht genau bestimmt werden, er ist materialabhängig und von der Größenordnung 1. Für $\lambda = 0.5$ geht Gl. 28 in Gl. 27 über. Für die Elemente Na, Al, P, Cl und K ist $s_c(E_i, E_0)$ als Funktion von E_0 in Abb. 21 dargestellt. Alle Kurven sind auf $s_c(E_{Na}, E_0=15) = 1.0$ bezogen. Die Anregungswahrscheinlichkeit besitzt für $E = 2.72 E_0$ ein Maximum und fällt bei kleineren Werten von E_0 sehr rasch und bei höheren Werten langsamer ab.

Ein mit der Wahrscheinlichkeit s_c ionisiertes Atom der Ordnungszahl Z sendet nur mit der Fluoreszenzwahrscheinlichkeit Fw ein Röntgenquant aus. Nach einer empirischen Formel / 10 /, die auf 0.5% genau ist, ergibt sich

$$Fw / (1-Fw) = (-6.4 + 3.4 Z - 0.000103 Z^3)^4 \cdot 10^{-8} \quad (29)$$

Mit der verbleibenden Wahrscheinlichkeit $1-Fw$ wird dagegen ein Auger-Elektron emittiert (vergl. Teil 2.3). Bei leichten Elementen überwiegt

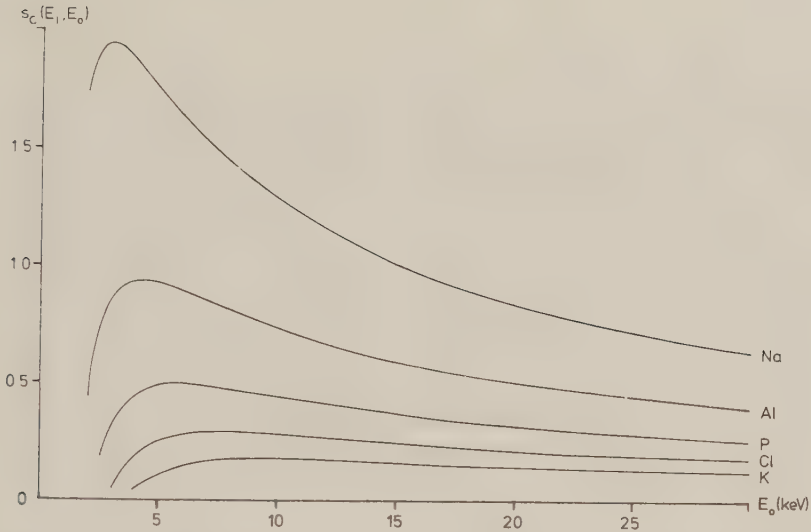


Abb. 21: Ionisierungswahrscheinlichkeit $s_c(E_i, E_o)$ als Funktion der Anregungsenergie E_o , dargestellt für die Elemente Na, Al, P, Cl und K mit Ionisierungsenergien E_i von 1.080, 1.559, 2.142, 2.819 und 3.607 keV.

der Anteil der Auger-Elektronen sehr stark, wie u.a. Tab. 5 zeigt. Insgesamt ergibt sich die Emissionswahrscheinlichkeit w_c eines Röntgenquants der Energie E_i^1 (die Quantenenergie E_i^1 ist etwas geringer als die Ionisierungsenergie E_i , vergl. Tab. 2 und Tab. 5) aus Gl. 27 und 29 zu

$$w_c(E_i^1, E_o) = Fw \cdot s_c(E_i, E_o) \quad (30)$$

Die Emissionswahrscheinlichkeiten s für Bremsstrahlung und s_c für charakteristische Strahlung sind in Tab. 5 für eine mittlere Anregungsenergie von $E_o = 15$ keV und $\lambda = 1$ wiedergegeben. Alle Werte sind jeweils auf $s(E_{Na})$ und $s_c(E_{Na}) = 1000$ bezogen. Außerdem zeigt die Tabelle den Quotienten $Q_s = s(\lambda=0.5)/s(\lambda=1.0)$, der angibt, wie sich die Bremsstrahlung im Bereich der charakteristischen Linien von Na bis Ca ändert, wenn Proben mit verschiedenen Materialkonstanten λ bestrahlt werden. Dieser Quotient sollte möglichst konstant bleiben, wenn nach einem Peak-zu-Untergrund-Verfahren quantifiziert werden soll, wie in Teil 5.1 erläutert wird.

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca
E_{α} (keV)	1.041	1.255	1.487	1.739	2.014	2.307	2.622	3.312	3.690
$s(E_{\alpha})$	1000	782	624	505	413	342	286	204	174
Q_s	0.789	0.777	0.764	0.751	0.737	0.722	0.707	0.676	0.658
E_i (keV)	1.080	1.303	1.559	1.838	2.142	2.470	2.819	3.607	4.038
$s_c(E_i)$	1000	791	638	522	431	361	305	223	192
F_w	0.0091	0.0137	0.020	0.028	0.038	0.051	0.067	0.109	0.136
w_c	1000	1162	1304	1439	1562	1673	1773	1909	1952
$Q_c(15)$	1.0	0.938	0.952	0.925	0.898	0.872	0.844	0.786	0.756
$Q_c(10)$	0.962	0.940	0.904	0.868	0.836	0.803	0.769	0.691	0.648
$Q_c(5)$	0.865	0.827	0.773	0.716	0.659	0.596	0.527	0.358	0.259
$T_{Si}(0.25)$	0.922	0.952	0.969	0.980	0.854	0.896	0.925	0.959	0.969
$T_{Be}(7.5)$	0.481	0.659	0.778	0.855	0.904	0.935	0.955	0.978	0.984
$T_{Be}(10.0)$	0.377	0.573	0.716	0.811	0.874	0.914	0.941	0.970	0.978
$A(14,7.5)$	0.283	0.465	0.628	0.769	0.770	0.895	1.0	1.143	1.188
$A(14,10.0)$	0.225	0.411	0.586	0.741	0.755	0.888	1.0	1.151	1.225
$A(12,10.0)$	0.235	0.425	0.603	0.758	0.767	0.895	1.0	1.129	1.163
$V(14,7.5)$	3.53	2.15	1.59	1.30	1.30	1.12	1.0	0.88	0.84
$V(14,10.0)$	4.44	2.43	1.71	1.35	1.32	1.13	1.0	0.87	0.83
$V(12,10.0)$	4.26	2.35	1.66	1.32	1.30	1.12	1.0	0.89	0.86

Tab. 5: Anregungswahrscheinlichkeit s und s_c , Fluoreszenzwahrscheinlichkeit F_w , Transmission T und daraus berechnete weitere Faktoren für Röntgenquanten von Na bis Ca.

Der Berechnung von $s(E_{\alpha})$ und $s_c(E_i)$ sind eine Anregungsenergie von $E_0 = 14$ keV und $\lambda = 1.0$ zugrundegelegt, diese Werte und $w_c = s_c \cdot F_w$ sind jeweils auf $s(\text{Na})$, $s_c(\text{Na})$ und $w_c(\text{Na}) = 1000$ bezogen.

Q_s ist der Quotient $s(\lambda=0.5)/s(\lambda=1.0)$, $Q_c(E_0) = s_c(E_0)/s(E_0)$ stellt das Verhältnis der Anregungswahrscheinlichkeiten für verschiedene E_0 dar.

Die Transmissionen $T_{Si}(x)$ und $T_{Be}(x)$ sind für die angegebenen Schichtdicken x (μm) berechnet. Die Produkte $A(E_0, x) = w_c(E_0) \cdot T_{Si} \cdot T_{Be}(x)$ und der Eichfaktor $V = 1/A$ sind jeweils auf $A(\text{Cl})$ und $V(\text{Cl}) = 1.0$ bezogen.

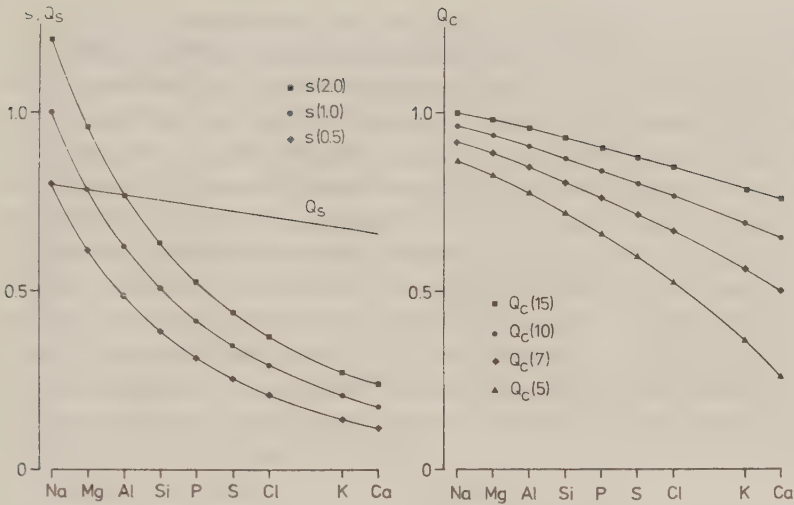


Abb. 22: Anregungswahrscheinlichkeit $s(\lambda)$ für verschiedene Parameter λ , berechnet mit $E_0 = 14$ keV, und Quotienten Q verschiedener Anregungswahrscheinlichkeiten für Röntgenenergien der Elemente Na bis Ca. $Q_S = s(\lambda=0.5)/s(\lambda=1.0)$ gibt an wie sich die Form der Bremsstrahlung für verschiedene Werte des materialabhängigen Parameters λ ändert. $Q_C(E_0) = s_C(E_0)/s(E_0)$ stellt das Verhältnis der Anregung von Bremsstrahlung und charakteristischer Strahlung dar.

Die Quotienten $Q_C(E_0) = s_C(E_0)/s(E_0)$ geben an, wie sich mit der Anregungsenergie E_0 das Verhältnis zwischen Bremsstrahlung und charakteristischer Strahlung verändert. Für die Berechnung von $s(E_0)$ wurde λ mit dem Wert 1 eingesetzt. Neben der numerischen Angabe von Q_S und Q_C in Tab. 5 sind beide Quotienten in Abb. 22 als Funktion der Ordnungszahl Z , dargestellt durch die Elementsymbole Na, $Z = 11$, bis Ca, $Z = 20$, wiedergegeben. Mit abnehmender Energie E_0 nimmt die charakteristische Strahlung der höherenergetischen Linien von Cl und K stärker ab als die im gleichen Energiebereich erzeugte Bremsstrahlung, während dieser Effekt bei niedrigeren Röntgenenergien, wie z.B. bei Na, weniger stark ausgeprägt ist.

Im Interesse eines möglichst hohen Signal-zu-Untergrundverhältnisses sollte darum eine möglichst hohe Anregungsenergie E_0 gewählt werden. Hohe Werte von E_0 bringen außerdem den Vorteil mit sich, daß die gesamte Meßanordnung eine bessere 'Spannungskonstanz' besitzt. Ändert sich bei einer Anregungsenergie von $E_0 = 15$ keV diese um 2 keV, sei es durch ungenaue Einstellung der Beschleunigungsspannung am Rasterelektronenmikroskop oder durch unterschiedlich starke Abbremsung der Elektronen in der Probe, dann beeinflußt diese Schwankung das Intensitätsverhältnis zwischen den $K\alpha$ -Linien von Na und K nur gering. Durch den Abfall der Anregungsenergie E_0 von 15 auf 13 keV wird die Na-Linie um 4% stärker angeregt als die K-Linie. Dagegen verursacht eine gleich große Spannungsänderung um 2 kV bei einer niedrigeren Ausgangsspannung von 10 kV eine Änderung des Intensitätsverhältnisses um 15%.

Eine Beschleunigungsspannung von 15 kV stellt also einen guten Kompromiß zwischen verschiedenen Forderungen dar: Das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis ist genügend hoch, die Spektrenform (d.h. die Form des Untergrundes) ist relativ konstant und die aufgenommenen Röntgenspektren sind noch weitgehend frei von unspezifischen Beiträgen, die nicht von Röntgenstrahlen aus dem angeregten Probenvolumen stammen.

4.3 Lokale Inhomogenitäten in der Probe

Lokale Inhomogenitäten im Massegehalt der Probe können durch unterschiedliche Absorptionseffekte und verschieden starke Abbremsung der Elektronen die Form der Spektren beeinflussen. Neben den natürlicher Weise in biologischem Weichgewebe vorkommenden Unterschieden im lokalen Massegehalt können Schockgefrieren und Gefriertrocknen während der Präparation zu lokalen Masseverdichtungen der Gewebeprobe führen. Wie bereits erwähnt, entstehen beim Schockgefrieren Eiskristalle, die mit zunehmender Entfernung von der Einfrieroberfläche an Größe zunehmen. Diese Eiskristallbildung führt zu lokalen Verdichtungen der Matrix. Beim anschließenden Gefriertrocknen können benachbarte Strukturen sich aufgrund von van-der-Waals-Kräften anziehen, wodurch eine weitere Kondensation von Matrixmaterial erfolgt. Durch diese Vorgänge wird die Struktur der Probe mehr oder weniger stark gekörnt.

Solange diese Kondensation multipel und feinkörnig erfolgt, wird die Elektronenabbremsung und die Selbstabsorption der Röntgenstrahlen im Schnitt kaum beeinflusst, da in diesem Fall das Produkt aus Dichte ρ und Weg x und damit die abbremmend bzw. absorptiv wirksame Schicht im Mittel gleich bleiben. Mit zunehmender Korngröße nimmt jedoch das Produkt $\rho \cdot x$ zu. Große Kondensationskerne bewirken somit eine scheinbare Dickenzunahme des Schnitts. Damit wird die mittlere Anregungsenergie E_0 geringer und die Absorption, besonders der niederenergetischen Röntgenstrahlen, wird erhöht.

Quantitativ sind die Auswirkungen in Tab. 6 dargestellt. Matrixbestandteile aus einem $(0.5 \mu\text{m})^3$ bzw. $(1.0 \mu\text{m})^3$ großen Würfel kondensieren zu einem kleineren, dichteren Würfel von $(0.31 \mu\text{m})^3$ bzw. $(0.63 \mu\text{m})^3$ Volumen, wobei die Dichte ρ von 0.25 auf $1.0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ zunimmt. Matrixverdichtungen in dieser Größenordnung können bei sehr schlechten Einfrierbedingungen oder in großer Entfernung von einigen $100 \mu\text{m}$ von der Einfrieroberfläche auftreten. Unter diesen Bedingungen nimmt E_0 von einem Mittelwert von 14.1 keV auf 13.9 bzw. 12.6 keV ab. Damit nimmt die Röntgenemission w_c zu, und zwar um bis zu 7% für Na und 4% für Cl. Gleichzeitig steigt die Absorption für Na an. Während aus einem

Target	x	$\rho \cdot x$	$\overline{E}_0$	K α	w_c	T	$w_c \cdot T$	I
C	0.0	0.25	14.1	Na	100	0.952	952	100
				Cl	173	0.997	1721	100
	0.5	0.31	13.9	Na	101	0.941	949	99.7
				Cl	174	0.996	1729	100.5
	1.0	0.63	12.6	Na	107	0.884	946	99.4
				Cl	180	0.992	1782	103.5
NaCl	0.0	0.006	14.1	Na	100	0.950	950	99.8
				Cl	173	0.996	1719	99.9
	1.0	0.14	13.6	Na	102	0.911	931	97.8
				Cl	175	0.983	1720	99.9
	2.0	0.29	13.0	Na	105	0.872	916	96.2
				Cl	178	0.971	1725	100.2
KCl	0.0	0.008	14.1	Na	100	0.947	947	99.5
				Cl	173	0.997	1721	100.0
	1.0	0.16	13.5	Na	103	0.864	887	93.2
				Cl	175	0.989	1734	100.8
	2.0	0.32	12.8	Na	106	0.786	833	87.5
				Cl	179	0.980	1751	101.7

Tab. 6: Einfluß von Inhomogenitäten auf die Abbremsung der Elektronen und die Absorption der charakteristischen K α -Strahlung von Na und Cl. Die Inhomogenitäten werden durch Matrixverdichtungen 'C' oder Kristallbildung in Schnitten mit 100 mM Gehalt an NaCl bzw. KCl verursacht. Die Symbole bedeuten:

x = Ausmaß der Kondensation bzw. Kristallisation (μm),

$\rho \cdot x$ = abbremsend und absorptiv wirksame Struktur ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \mu\text{m}$),

$\overline{E}_0$ = mittlere Anregungsenergie der Elektronen im Schnitt (keV),

w_c = relative Röntgenemission, bezogen auf $w_c(\text{Na}, x=0) = 100\%$,

T = Transmission und

I = relative Linienintensitäten, bezogen jeweils auf $w_c(\text{Na}, x=0)$ und $w_c(\text{Cl}, x=0) = 100\%$.

Weitere Erklärung im Text.

homogenen Schnitt 95% der angeregten Quanten zum Röntgendetektor gelangen, sind es nur noch 88% bei einem Schnitt mit Verdichtungen aus $(1\text{ }\mu\text{m})^3$ Volumen. Für die Cl-Quanten beträgt die Absorption nur max. 1%. Durch diese gegensätzlichen Effekte wird die Na-Intensität um max. 1% verringert, die Cl-Intensität dagegen um 4% erhöht.

Neben der Kondensation von Matrixmaterial wird in gefriergetrockneten Schnitten die Bildung von Elektrolytkristallen beobachtet. In dichten intrazellulären Strukturen bilden sich größere Kristalle nur in tieferen, weiter von der Einfrieroberfläche entfernten Schichten. Dagegen kommt es in Gewebestrukturen mit geringem (Interstitium) oder fehlendem Matrixanteil (Tubuluslumen) zur Ausbildung von Kristallen, die aus einem Lösungsvolumen von $(1\text{ }\mu\text{m})^3$ bis $(2\text{ }\mu\text{m})^3$ stammen können. Tab. 6 gibt an, wie die Intensitäten der Na- und Cl-Linie durch solche Elektrolytkristalle beeinflusst werden. Die Rechnungen sind ohne Kristallbildung ($x = 0.0$) und bei Kristallbildung aus einem Volumen von $(1\text{ }\mu\text{m})^3$ bzw. $(2\text{ }\mu\text{m})^3$ durchgeführt. Die Spalte $\rho \cdot x$ gibt die zusätzlich zur homogenen Matrix ($\rho \cdot x = 0.25$) abbremssend und absorptiv wirksame Struktur an. Aus der Summe beider Werte ist die mittlere Anregungsenergie $\overline{E}_0$ berechnet. Bei einem Schnitt aus einem Standard mit 100 mM NaCl ergibt sich eine maximale Verringerung der Na-Intensität um 4%, während die Cl-Linie praktisch unbeeinflusst bleibt. Bei einem 100 mM KCl-Standardschnitt überwiegt bei der Na-Linie die Absorption, während sich bei der Cl-Linie der Abbremsseffekt stärker auswirkt, so daß die Na-Intensität um bis zu 12% abnimmt und die Cl-Intensität um 2% zunimmt.

Aus diesen Berechnungen wird ersichtlich, daß nur eine sehr starke Kristallbildung oder Matrixkondensation die Quantifizierung beeinträchtigen sollte. Für zelluläre Messungen nahe der Einfrieroberfläche müssen daher diese Effekte nicht berücksichtigt werden. Weiter entfernt von der Einfrieroberfläche, im Interstitium oder bei einer schlechten Einfriertechnik nehmen diese Effekte jedoch an Bedeutung zu. Man kann annehmen, daß Kondensation und Kristallbildung am selben Ort auftreten und sich daher in ihrer Wirkung potenzieren. Unter diesen Bedingungen können Untergrund und Linienintensitäten stärker verändert werden, was bei der Quantifizierung berücksichtigt werden müßte.

Neben ihrer Auswirkung auf die Selbstabsorption der Röntgenquanten und eine erhöhte Abbremsung der Elektronen können lokale Inhomogenitäten auch die Zahl der Anregungen von Röntgenquanten beeinflussen. Mit zunehmender Abbremsung werden die Elektronen in der Probe nicht nur verlangsamt, sondern auch seitlich abgelenkt, wodurch ihr Weg in der Probe vergrößert wird. Da die Zahl der angeregten Röntgenquanten dem Produkt aus der Zahl der anregenden Elektronen ($= \text{Strom} \cdot \text{Zeit}$) und ihrem Weg in der Probe direkt proportional ist, nimmt die Wahrscheinlichkeit einer multiplen Erzeugung von Röntgenquanten zu. Auch dieser Effekt wirkt sich also wie eine Zunahme der Probendicke aus.

4.4 Konstanz äußerer Parameter

Um die Spektren miteinander vergleichen zu können, ist es erforderlich, bei der Analyse einige äußere Parameter wie Beschleunigungsspannung, Probenstrom, Meßzeit und Geometrie zwischen Detektor und Probe konstant zu halten. Der Einfluß einer Variation der Beschleunigungsspannung wurde in Teil 4.2 diskutiert. Das Produkt aus Probenstrom und Meßzeit beeinflusst die Intensität des gesamten Spektrums gleichmäßig in jedem Kanal. Für eine quantitative Analyse ist darum die Überwachung des Probenstroms und die Verwendung eines totzeitkorrigierten Analysators eine unabdingbare Voraussetzung. Sehr stark wirkt sich außerdem eine Veränderung der Geometrie zwischen Detektor und Probe auf die Röntgenspektren aus, während die Größe der Rasterfelder die Messung nur sehr gering beeinflusst.

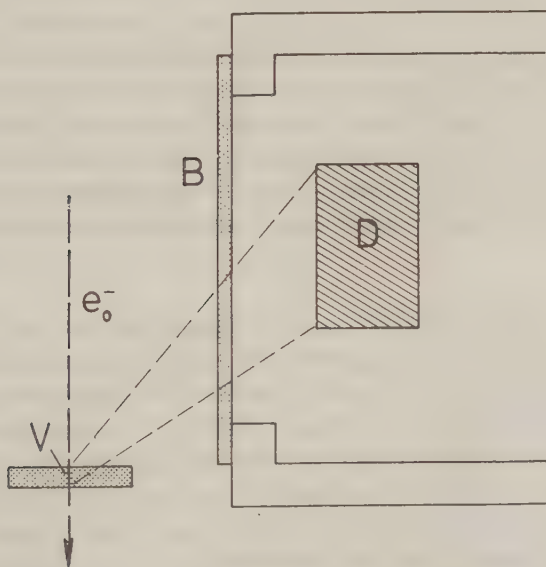


Abb. 23: Anordnung von Probe und Detektor.

Die Symbole bedeuten e_0^- anregende Elektronen, V angeregtes Probenvolumen, B Be-Fenster und D Detektorkristall.

Die Anordnung von Probe und Detektor zeigt Abb. 23. Der mittlere Abstand zwischen Detektor D und angeregtem Probenvolumen V beträgt etwa 8 mm. Wird der Detektor um nur 0.5 mm verschoben, ändert sich der vom Detektor erfaßte Raumwinkel und damit die Intensität des gesamten Spektrums gleichmäßig um über 10%. Wird dagegen bei gleichem mittlerem Abstand die Höhe zwischen Detektor und Probe verändert, so trifft die Strahlung unter einem anderen Winkel auf das Eintrittsfenster B. Durch eine Höhenzunahme um 1 mm wird der Weg der Röntgenstrahlen im Be-Fenster um etwa 2 μm vergrößert, wodurch die Absorption zunimmt. Die Na-Linie wird um 20% stärker geschwächt, während die Cl- und K-Linien mit etwa 1% Intensitätsabnahme kaum beeinflußt werden.

Eine Höhenveränderung hat außerdem einen Einfluß auf das Verhältnis zwischen charakteristischer Strahlung und Untergrund. Die charakteristische Strahlung wird isotrop, die Bremsstrahlung anisotrop bevorzugt senkrecht zur Einfallrichtung der Elektronen abgestrahlt /32/. Da die Elektronen bei der Passage durch die Schnitte auch seitlich abgelenkt werden, ist diese Anisotropie umso ausgeprägter, je dünner der Schnitt ist. Durch eine Höhenzunahme zwischen Detektor und Probe wird also das Signal-zu-Untergrundverhältnis größer. Allerdings nimmt mit zunehmender Höhe der vom Detektor erfaßte Raumwinkel ab, wodurch die Quantenausbeute sinkt. Man wird also eine Einstellung anstreben, die einen Kompromiß zwischen erhöhtem Signal-zu-Untergrundverhältnis und genügender Quantenausbeute darstellt.

Die Größe des Rasterfeldes hat nur einen geringen Einfluß auf die Messung. Wie A.Dörge und K.Gehring gezeigt haben /22/, tritt durch die Bestrahlung ein Masseverlust von etwa 20% auf. Er betrifft jedoch nur die Matrixbestandteile C, N und O und insoweit auch S, als S z.B. als Disulfid und nicht als Sulfat gebunden ist. Der Masseverlust ist nach einer Strombelastung von 10 nCb $\cdot \mu\text{m}^{-2}$ weitgehend abgeschlossen. Bei unseren Messungen kann sich dieser Effekt also nur auswirken, wenn ein sehr großes Rasterfeld von mehreren 100 μm^2 bestrahlt wird. Dieses Spektrum zeigt dann einen etwas höheren Untergrund, verglichen mit einem Spektrum von einem kleineren Rasterfeld desselben Gebiets. Die Linienintensitäten bleiben jedoch, abgesehen von S, unbeeinflußt.

4.5 Nicht-probenspezifische Anteile eines Röntgenspektrums

Die Quantifizierung eines Röntgenspektrums setzt voraus, daß das gesamte Spektrum nur von Beiträgen aus dem angeregten Probenvolumen stammt, oder daß unspezifische Beiträge leicht zu bestimmen sind und gesondert berücksichtigt werden können, oder daß ein Quantifizierungsverfahren verwandt wird, bei dem solche Beiträge nicht stören. Zwei bereits erwähnte Beiträge, die nicht von Röntgenstrahlen stammen, werden durch das elektronische Rauschen des Analysators und durch rückgestreute Elektronen hervorgerufen. Das elektronische Rauschen war jedoch nur bei dem älteren EDAX-Analysator so stark ausgeprägt, daß eine Noise-Zacke in den ersten Kanälen der Spektren extra berücksichtigt werden mußte. Da die rückgestreuten Elektronen bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und einer Dicke des Be-Fensters von 8 bis 10 μm nur einen ganz schwach erkennbaren Buckel zwischen 6 und 11 keV erzeugen, wird die Analyse im Bereich zwischen 0.6 und 4 keV durch diesen Effekt ebenfalls nicht beeinflusst.

Unspezifische Beiträge können auch von Röntgenstrahlen stammen, die nicht innerhalb der Probe angeregt werden. Ein Beispiel dafür ist der Ni-Peak, der von dem sog. 'Dunkelfeld' angeregt wird. Damit werden Elektronen bezeichnet, die an der letzten Blende (B_3 in Abb. 3) gestreut und nicht auf die Probe fokussiert werden. Normalerweise ist ihre Intensität sehr gering, der gesamte Strom, der das Ni-Grid trifft, beträgt weniger als 0.1 % des Probenstroms.

Um zu prüfen, ob und wie stark Röntgenquanten aus dem Bohrloch der Probenbühne zu einem Röntgenspektrum beitragen, wurde dieselbe Stelle einer Probe zweimal bestrahlt. Als Probe wurde ein 0.75 μm dicker Schnitt einer 25% Dextranlösung mit 100 mM KCl- und 200 mM NaCl-Gehalt gewählt. Dabei wurde ein Schnitt ausgesucht, der sehr nahe an der Kante der Öffnung des Ni-Grids lag. Zuerst wurde das Grid so gedreht, daß die Probe P entfernt von der inneren Wand des Bohrlochs lag. Diese Meßanordnung ist in Abb. 25A dargestellt, Abb. 24A gibt das so aufgenommene Spektrum wieder. Dann wurde das Grid um 180° gedreht, wie in Abb. 25B gezeigt ist. Dieselbe Stelle wurde gleich lang und mit demselben Probenstrom bestrahlt. Die charakteristischen Linien des in dieser Anordnung erhaltenen Spektrums, Abb. 24B, sind genauso hoch wie die des ersten Spektrums. Ein

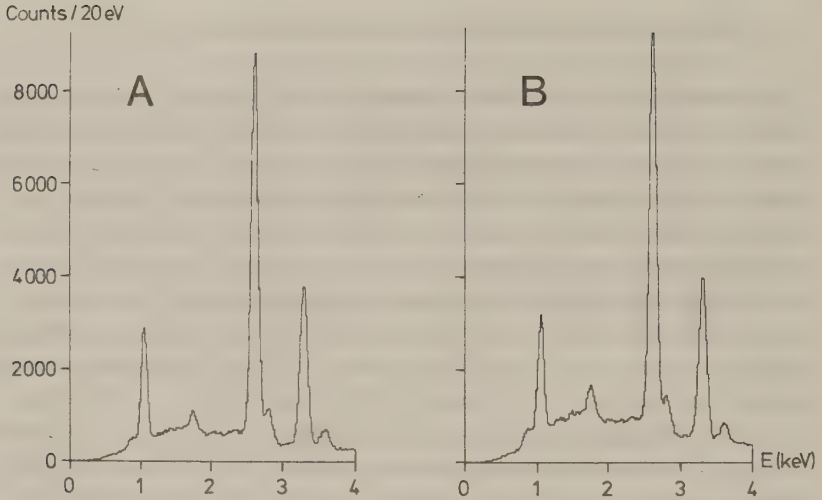


Abb. 24: Zwei Röntgenspektren von derselben Stelle eines Schnitts mit unterschiedlich hohen unspezifischen Beiträgen zum Untergrund je nach Lage des Ni-Grids.

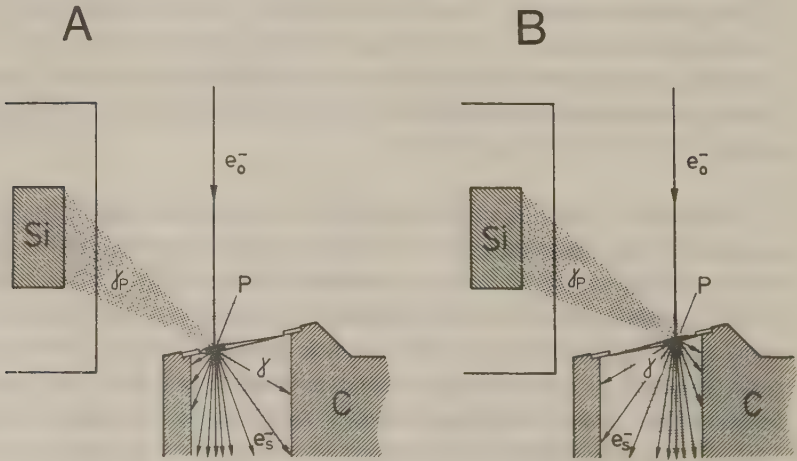
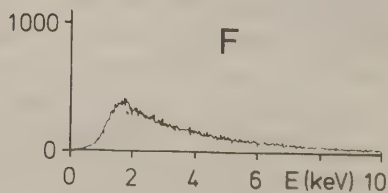
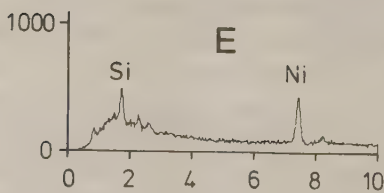
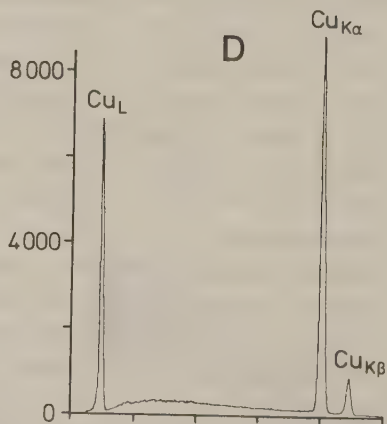
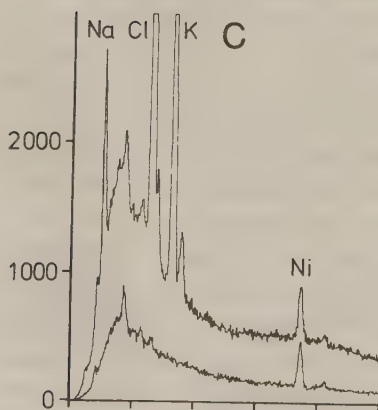
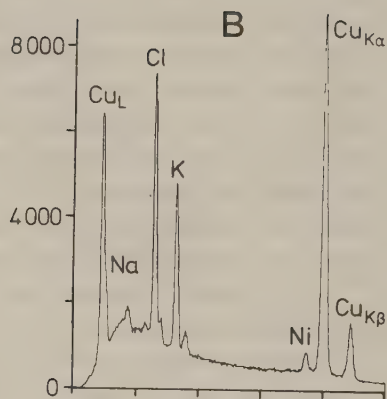
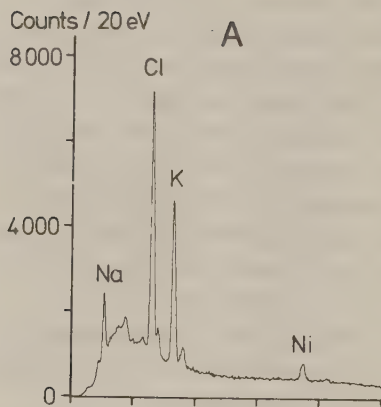


Abb. 25: Veränderung der Geometrie zwischen Probe und Bohrlochwand als Erklärung des unterschiedlich hohen Untergrunds der Spektren A und B in Abb. 24. Die Symbole bedeuten e_0^- anregende, e_s^- gestreute Elektronen, P Probe, C Probenbühne, Si Detektor, γ_p und γ Röntgenstrahlung.

anderes Ergebnis war auch nicht zu erwarten, da die Geometrie für die Messung der Röntgenstrahlen aus der Probe, γ_p , nicht verändert wurde.

Dagegen ist der Untergrund des zweiten Spektrums, Abb. 24B, deutlich erhöht. Wegen des Masseverlusts bei der Bestrahlung wäre eine geringe Abnahme des Untergrundes verständlich, da das zweite Spektrum aus einer schon vorbestrahlten Stelle stammt. Eine Zunahme des Untergrundes kann daher nur von nicht-probenspezifischen Röntgenstrahlen hervorgerufen werden, die in der Wand des Bohrlochs angeregt werden. Diese unspezifische Röntgenstrahlung wird in der Anordnung 25B durch zwei Effekte gegenüber der Anordnung 25A verstärkt. Liegt die Probe entfernt von der inneren Wand des Bohrlochs, dann ist die Intensität der Streuelektro-
nen e_s^- , die die Wand treffen, gering, liegt sie nahe der Wand, ist sie deutlich erhöht. Außerdem ist der Raumwinkel, unter dem die unspezifische Röntgenstrahlung γ erfaßt wird, in B größer als in A. Beide Effekte zusammen bewirken eine Zunahme des Untergrundes um fast 40%.

Um alle unspezifischen Beiträge unter Normalbedingungen, wenn die Probe ungefähr in der Mitte des Ni-Grids liegt, quantitativ genauer zu erfassen, wurde folgender Versuch durchgeführt. Ein 0.75 μm dicker Schnitt einer Dextranlösung (25% Dextran, 100 mM KCl, 100 mM NaCl) wurde gemessen und ergab das Spektrum A in Abb. 26. Dann wurde die Wand des Bohrlochs mit einer dünnen Cu-Folie ausgekleidet und dieselbe Stelle des Schnitts in der gleichen Position wie zuvor gemessen. Durch die in der Probe gestreuten Elektronen wurde die Cu-Folie angeregt, und es entstand das Spektrum B mit der starken Cu-Linie. Nun wurde ein reines Cu-Spektrum so lange gemessen, Abb. 26D, bis die $K\alpha$ -Linie von Cu gleich hoch war wie in dem zuvor aufgenommenen Spektrum. Die für diese Messung nötige Ladungsmenge betrug weniger als 2% der Menge, die zur Anregung der Spektren A und B nötig war, d.h. weniger als 2% der Beschüßelektro-
nen werden so abgelenkt, daß sie in der Wand des Bohrlochs ein Röntgen-
signal erzeugen, das vom Detektor aufgenommen werden kann. Mit derselben geringen Ladung wurde das reine C-Spektrum F gemessen. Das 'Spektrum der Folie' zeigt Abb. 26E. Es wurde aus einer Messung auf der Folie gewonnen und setzt sich aus Röntgenstrahlen zusammen, die zum Teil aus der Folie stammen, und zum anderen Teil von dem Dunkelfeld in dem Ni-Grid und in der Probenbühne aus reinem C angeregt werden. Die Summe aller unspezifischen Beiträge E und F ist in Abb. 26C dem Originalspektrum gegenübergestellt, sie macht etwa 30% des Untergrundes des Probenspektrums aus.



Die vorliegende Abschätzung nicht-probenspezifischer Beiträge zu einem Röntgenspektrum ist nicht exakt quantitativ, da die Abbremsung der Elektronen bei der Streuung in der Probe und die veränderte Geometrie der Anregung im Bohrloch nicht berücksichtigt wurde. Beide Effekte wirken sich jedoch gegensätzlich aus und kompensieren sich darum zumindest teilweise. Der 'Meßwert' von 30% unspezifischem Untergrund dürfte eine recht gute Abschätzung der tatsächlichen Verhältnisse darstellen. Man kann erwarten, daß unspezifische Beiträge zu einem Spektrum mit zunehmender Schnittdicke zuerst zunehmen und dann ein Maximum erreichen. Darum muß man für die Quantifizierung der Spektren ein Verfahren wählen, bei dem diese Beiträge nicht stören.

vorhergehende Seite:

Abb. 26: Unspezifische Beiträge zu einem Röntgenspektrum

A: Spektrum eines Dextranstandards,

B: Spektrum derselben Stelle, wobei das Bohrloch mit Cu ausgekleidet war,

C: Summe der Spektren E und F, verglichen mit dem Originalspektrum A,

D: reines Cu-Spektrum,

E: Spektrum der Formvar-Folie,

F: reines C-Spektrum, mit gleicher Intensität aufgenommen wie das Cu-Spektrum (D).

4.6 Linearität des Meßverfahrens

Die Quantifizierung unterschiedlich hoher Elektrolytkonzentrationen setzt voraus, daß die Linienintensitäten der Röntgenspektren den Elementkonzentrationen in der Probe proportional sind. Die Linearität des Meßverfahrens wurde mithilfe von Dextranstandards nachgeprüft. Dazu wurden Dextranlösungen mit 25% Gehalt Dextran und unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen hergestellt. Davon wurden Tropfen mit etwa 0.3 mm Durchmesser in Propan von 85 K schockgefroren. Von diesen Tropfen wurden, wie es in Teil 2.1 beschrieben ist, 0.75 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Elektrolytkonzentrationen der verschiedenen Lösungen sind in Tab. 7 wiedergegeben. Die Lösungen enthielten (bis auf Nr. 3) 100 mM K, Na-Konzentrationen zwischen 5 und 200 mM und Cl-Konzentrationen zwischen 100 und 300 mM. Diese Konzentrationen wurden flammenfotometrisch für Na und K und potentiometrisch für Cl gemessen.

Abb. 27 zeigt vier Spektren von Schnitten der Standardlösungen 1 bis 4. Die durchgezogenen Kurven stellen die berechneten Spektren mit jeweiligem Untergrund dar. Daraus wird deutlich, daß von dem Programm selbst sehr kleine Linienintensitäten von weniger als 500 Impulsen exakt aufgelöst und vom Untergrund getrennt werden können.

Lösung	Konzentrationen (mM)				n	Intensitätsquotient	
	Na	P	Cl	K		Na/K ₁₀₀	Cl/K ₁₀₀
1	5.3		103	97	12	0.013	0.940
2	11		108	98	9	0.027	0.980
3	35	48	127	145	12	0.091	1.140
4	96		196	98	21	0.245	1.770
5	186		289	97	14	0.484	2.630

Tab. 7: Elektrolytkonzentrationen der verschiedenen Eichstandards, Anzahl der gemessenen Schnitte (n) und Mittelwert des Quotienten der Intensitäten der Na- bzw. Cl- und der K-Linien (bezogen auf K = 100 mM).

Counts/20eV

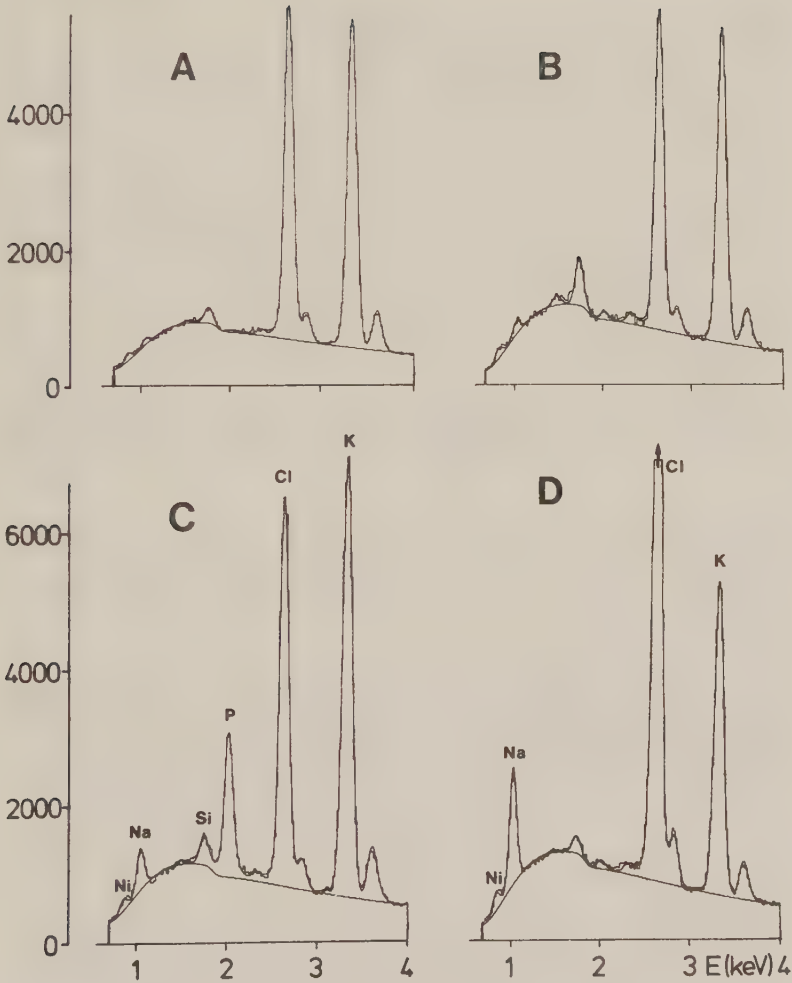


Abb. 27: Spektren verschiedener Standard-Dextranschnitte.

Die Spektren A bis D wurden von Schnitten mit Na- Cl und K-Konzentrationen (mM) von jeweils 5, 103 und 97 (A), 11, 108 und 98 (B), 35, 127 und 145 (C) sowie 96, 196 und 98 (D) gewonnen.

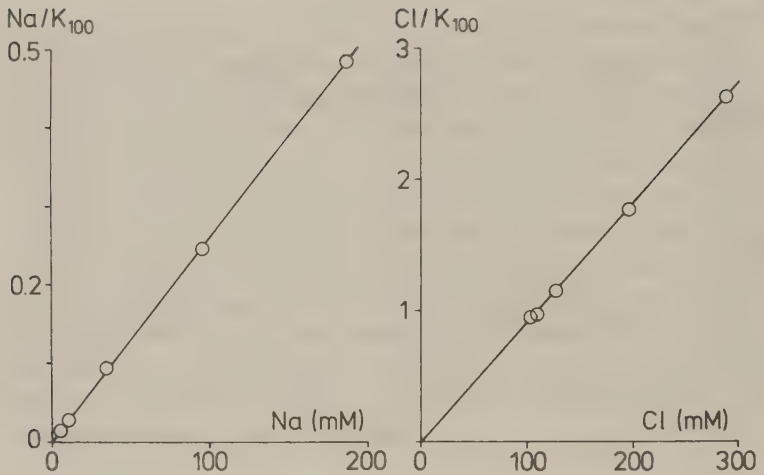


Abb. 28: Quotienten der Na- bzw. Cl-Intensität und der K-Intensität (bezogen auf K = 100 mM) als Funktion der Na- bzw. Cl-Konzentration.

Die Meßergebnisse sind in Tab. 7 als Quotienten der Linienintensitäten, bezogen auf die K-Linie, wiedergegeben. Durch diese Darstellung kommen Schwankungen in der Schnittdicke, die sich auf alle Linienintensitäten gleich auswirken, nicht zum Tragen. Außerdem sind alle Quotienten auf eine K-Linie, die 100 mM Intensität entsprechen würde, umgerechnet. In Abb. 28 sind die Quotienten von Na/K_{100} und von Cl/K_{100} gegen die Na- bzw. Cl-Konzentrationen aufgetragen. Sowohl für Cl, als auch für Na ergibt sich eine ausgezeichnete Linearität über den gesamten Konzentrationsbereich von 5 bis zu 200 mM für Na und von 100 bis zu 300 mM für Cl, also über zwei Zehnerpotenzen. Diese Konzentrationen umfassen alle physiologischerweise vorkommenden Konzentrationen (mit Ausnahme höherer Na-Konzentrationen in der Papille der Rattenniere). Darum kann man erwarten, mithilfe der EMA unter Anwendung der angegebenen Präparations- und Analysetechnik quantifizierbare Meßdaten zu erhalten.

5 Quantifizierungsverfahren

Die Linienintensitäten I_i der charakteristischen Strahlung eines Röntgenspektrums sind ein Maß für den Gehalt an Elementen, die in dem angeregten Probenvolumen vorliegen. Wenn die Anregungs- und Absorptionsverhältnisse bekannt sind, kann daraus die Menge der angeregten Elemente relativ zueinander bestimmt werden. Physiologisch relevant sind aber die absoluten Elektrolytkonzentrationen, zu deren Berechnung das angeregte Probenvolumen bekannt sein muß. Eine wesentliche Voraussetzung für die Festlegung des angeregten Volumens wäre die Kenntnis der Schnittdicke. Wegen thermischer Schwankungen, bedingt durch die diskontinuierliche Kühlung des Kryotoms, und wegen des mechanischen Spiels des Schneidearms kann die Dicke der Schnitte jedoch bis zu $0.5\text{ }\mu\text{m}$ variieren. Außerdem können die Dünnschnitte beim Schneiden gestaucht oder bei der Abnahme vom Messer gedehnt werden, wodurch die Unsicherheit in der Bestimmung des angeregten Probenvolumens noch vergrößert wird.

Eine absolute Quantifizierung wird darum erst mithilfe geeigneter Standards möglich, wobei zwei verschiedene Verfahren angewandt werden können. Bei dem 'Peak-zu-Untergrund'-Verfahren wird das Verhältnis von Linien- und Untergrundintensitäten aus Probenspektren mit denselben Quotienten aus Standardspektren verglichen, woraus Elementkonzentrationen pro Trockengewicht berechnet werden können. Bei der Quantifizierung mithilfe eines internen Standards wird gleichzeitig mit der Gewebeprobe ein Standard mit eingefroren und mitgeschnitten, so daß aus dem Vergleich der Linienintensitäten in Probe und Standard Elementkonzentrationen pro Feuchtgewicht berechnet werden können.

Die Quantifizierung beruht also auf einem Vergleich von Probenspektren mit Spektren eines Standards bekannter Zusammensetzung. Dabei sollten die Standards in ihrer Zusammensetzung und vorausgegangener Präparation der untersuchten Probe weitgehend ähnlich sein. Dann liegen in Probe und Standard die gleichen Anregungs- und Absorptionsverhältnisse vor, und die Elementkonzentrationen können nach dem Prinzip des Dreisatzes berechnet werden.

5.1 Peak-zu-Untergrund

Ein Quantifizierungsverfahren, das auf einem Vergleich zwischen Proben- und Standardspektren beruht, stellt die von Marshall, Hall und Höhling entwickelte Methode dar [28,29,40]. In einem Standard und in der Probe wird das Verhältnis

$$W_i = I_i / BS \quad (31)$$

bestimmt, wobei I_i die Intensität der Linie des Elements i und BS die Intensität der Bremsstrahlung ist. Die Konzentration C_i des gesuchten Elements erhält man aus der Beziehung

$$C_{i,Probe} = W_{i,Probe} / W_{i,Std} \cdot A_i \left(N_i / \sum_j N_j Z_j^2 \right)_{Std} \left(\sum_j C_j Z_j^2 / A_j \right)_{Probe} \quad \text{Gl. (32)}$$

mit N = Anzahl der Atome (cm^{-3}), Z = Ordnungszahl, A = Atomgewicht. Werden Standards verwendet, die ähnlich wie die Probe zusammengesetzt sind, kann Gl. 32 vereinfacht werden zu

$$C_{i,Probe} = W_{i,Probe} / W_{i,Std} \cdot C_{i,Std} \quad (33)$$

Diese Methode hat den Vorteil, von Änderungen im Probenstrom, der Meßzeit oder dem angeregten Probenvolumen unabhängig zu sein, da diese Änderungen die charakteristische und die Bremsstrahlung in gleicher Weise beeinflussen. Ihre Präzision wird jedoch eingeschränkt, je größer der Anteil unspezifischer, nicht in der Probe angeregter Bremsstrahlung ist, und je stärker der Anteil zwischen spezifischer und nicht spezifischer Bremsstrahlung durch Veränderung der Geometrie zwischen Probe und Probenbühne oder durch größere Dickenschwankungen variiert.

Ein weiterer Nachteil des Peak-zu-Untergrund-Verfahrens liegt darin, daß die Elementkonzentrationen pro Trockengewicht (TG) der Probe berechnet werden. Nur in homogenen Proben mit gleichmäßig hohem, bekanntem TG kann daraus die physiologisch interessante Konzentration pro Feuchtgewicht (FG) berechnet werden. Wenn jedoch das TG verschiedener Zelltypen oder umschriebener Zellkompartimente schwankt, wie z.B. in der Niere, dann ist eine Berechnung der FG-Konzentrationen mit dieser Methode nicht möglich.

5.2 Interner Standard

Von A.Dörge wurde ein Quantifizierungsverfahren beschrieben /18/, das mithilfe eines internen Standards die Berechnung der Elementkonzentrationen ermöglicht. Unmittelbar vor dem Schockfrieren wird auf die Einfrieroberfläche ein dünner Film einer 20 bis 25 %-igen Albuminlösung bekannter extrazellulärer Elektrolytkonzentration aufgetragen und zusammen mit dem Gewebe schockgefroren und geschnitten. Damit besitzt jeder Schnitt seinen eigenen 'internen' Standard, der gleich dick ist wie der Schnitt selbst. Die gesuchten Elementkonzentrationen im Gewebe C_i berechnen sich einfach als

$$C_i = C_{i,Std} \cdot I_i / I_{i,Std} \quad (34)$$

aus dem Verhältnis der Linienintensitäten I_i und $I_{i,Std}$ in der Probe und im Standard, multipliziert mit der bekannten Elementkonzentration $C_{i,Std}$ im Standard.

Da die üblicherweise verwendeten extrazellulären Albumin-Standardlösungen nur Na und Cl in so hohen Konzentrationen enthalten, daß ein statistisch gut gesichertes Ergebnis in einer Meßzeit von 100 bis 200 sec erzielt werden kann, wird die Quantifizierung der übrigen Elemente nicht über den direkten Vergleich der Intensitäten derselben Linie, sondern über einen Vergleich mit der Cl-Linie des Standards durchgeführt. Um die hierfür nötigen Eichfaktoren zu ermitteln, müssen einmal Albuminstandards hergestellt und analysiert werden, die außer dem Referenzelement Cl noch die übrigen in Frage kommenden Elemente in bekannter Konzentration enthalten. Dann können Eichfaktoren V_i bestimmt werden aus

$$(V_i \cdot I_i) / I_{Cl} = C_i / C_{Cl} \quad \text{oder} \\ V_i = C_i / C_{Cl} \cdot I_{Cl} / I_i \quad (35)$$

Der Eichfaktor ist also eine Zahl, mit der eine Linienintensität I_i multipliziert werden muß, um einen Konzentrationsvergleich eines Elements i mit dem Referenzelement (Cl) zu ermöglichen. Sind diese Faktoren V_i einmal bestimmt, erhält man die Konzentration des Elements i im Gewebe aus Gl. 35 als

$$C_i = I_i / I_{Cl,Std} \cdot V_i \cdot C_{Cl,Std} \quad (36)$$

Diese Methode ist anwendbar, wenn die Abbrems- und Absorptionseffekte in Probe und Standard entweder gleich groß oder vernachlässigbar sind. Wie in Abschnitt 4.2 und 4.3 beschrieben wurde, wird wegen der Abbremsung der Elektronen in einem 1 μm dicken, gefriergetrockneten Schnitt von 25% TG die Anregungsenergie der Elektronen von 15 keV auf im Mittel 14 keV verringert. Dadurch wird die Na-Linie um etwa 4% und die Cl-Linie um 3% stärker angeregt. Gleichzeitig wird aber das Na-Signal durch Absorption innerhalb der Probe um etwa 5% geschwächt, während die Absorption der Cl-Linie unter 1% liegt. Insgesamt heben sich also beide Effekte in einem 1 μm dicken Schnitt teilweise auf, und es resultiert für Na eine Verringerung des Röntgensignals um 1%, für Cl eine Verbesserung um 2%.

Die Eichfaktoren $V_{i,\text{exp}}$, die in 1 μm dicken Albuminstandards bestimmt wurden, sind in Tab. 8 aufgeführt. Sie sind mit Faktoren verglichen, die theoretisch aus den Anregungswahrscheinlichkeiten und den Absorptionseffekten berechnet werden können (vergl. Tab. 5). Die Übereinstimmung zwischen den experimentell bestimmten und den theoretisch berechneten Faktoren ist sehr gut, was sowohl für die Richtigkeit der theoretischen Grundlagen (Ionisierungs- und Fluoreszenzwahrscheinlichkeit) als auch für eine saubere experimentelle Präparation spricht.

	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca
V_{exp}	3.80	2.20	1.60	1.30	1.20	1.08	1.0	0.90	0.83
$V(14,7.5)$	3.53	2.15	1.59	1.30	1.30	1.12	1.0	0.88	0.84
$V(12,10)$	4.26	2.35	1.66	1.32	1.30	1.12	1.0	0.89	0.86

Tab. 8: Experimentell und theoretisch bestimmte Eichfaktoren V_i .
Die theoretischen Werte sind Tab. 5 entnommen und mit Anregungsenergien von 14 bzw. 12 keV und Dicken des Be-Fensters von 7.5 bzw 10 μm berechnet.

5.3 Messungen von Standardschnitten

Zur experimentellen Prüfung der beiden in Teil 5.1 und 5.2 beschriebenen Quantifizierungsverfahren wurden Schnitte von zwei verschiedenen Albuminlösungen hergestellt. Die Zusammensetzung beider Standards zeigt Tab. 9. Von diesen Lösungen wurden Tröpfchen von 0.3 mm Durchmesser schockgefroren, und mit der beschriebenen Präparationstechnik wurden Schnitte von 0.75 und 1.5 μm Dicke hergestellt. In 20 aufeinanderfolgenden 0.75 μm dicken Schnitten des Standards 'a' wurden je 3 Messungen an verschiedenen Stellen desselben Schnitts vorgenommen. Die Rasterfelder bedeckten eine große Fläche von 100 bis 200 μm^2 , um Fehler durch lokale Inhomogenitäten in den Proben weitgehend auszuschließen.

Standard	TG	Elektrolytkonzentrationen (mM)			
		Na	P	Cl	K
a	25	95.2	34	150.5	48.5
b	25	103.8	(6)	78.5	22.8

Tab. 9. Zusammensetzung der Albuminstandards.

Für die Intensitäten von Na und K und für die Quotienten aus den Intensitäten dieser Linien und der Bremsstrahlung BS sowie der Cl-Intensität sind die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten VK von je 3 Messungen in Tab. 10 wiedergegeben. Die Mittelwerte der Na- und der K-Intensitäten in verschiedenen Schnitten weichen bis zu 30% von dem Mittelwert aller 20 Schnitte ab. Nach diesem Ergebnis schwankt die Dicke verschiedener Schnitte um bis zu 0.4 μm . Der Variationskoeffizient der Linienintensitäten von 3 Messungen desselben Schnitts beträgt max. 20%, was auf entsprechend große Dickenschwankungen innerhalb eines einzelnen Schnitts hinweist.

Die Variationskoeffizienten der Quotienten $Q(L/BS)$ von Linienintensitäten und der Bremsstrahlung bzw. von Linien- und der Cl-Intensität ($Q(L/Cl)$) erlauben eine Beurteilung der beiden Quantifizierungsverfahren 'Peak-zu-Untergrund' und 'Interner Standard'. Im Mittel

Na	Na/BS	Na/Cl	VK(Na	Na/BS	Na/Cl, %)	K	K/BS	K/Cl	VK(K	K/BS	K/Cl, %)
2064	0.048	0.186	22	5	3	4059	0.095	0.367	19	7	7
2204	0.042	0.162	2	22	10	5032	0.094	0.367	9	14	2
2264	0.051	0.188	10	10	10	4347	0.098	0.361	1	3	2
1641	0.044	0.174	2	13	8	3369	0.089	0.355	8	8	2
1837	0.043	0.168	5	13	10	3939	0.091	0.358	5	5	2
2136	0.047	0.175	9	12	8	4403	0.096	0.360	7	9	3
1823	0.049	0.175	9	19	13	3737	0.100	0.358	6	8	2
2119	0.053	0.193	18	7	6	3901	0.099	0.357	15	9	3
2124	0.052	0.190	7	9	5	4082	0.100	0.365	7	4	1
1715	0.046	0.163	11	9	1	3912	0.106	0.373	9	12	3
2260	0.048	0.158	8	17	7	4527	0.096	0.369	12	12	2
2098	0.048	0.176	1	10	2	4209	0.095	0.352	5	8	4
2121	0.050	0.207	8	3	5	3612	0.085	0.353	1	9	5
1508	0.053	0.199	10	20	7	2761	0.096	0.365	5	15	3
2054	0.051	0.188	5	10	4	4215	0.104	0.371	2	5	1
1562	0.046	0.181	1	3	6	3196	0.093	0.370	7	11	4
2452	0.051	0.202	3	3	4	4259	0.089	0.351	5	4	3
2496	0.046	0.183	10	8	3	4888	0.090	0.357	16	14	4
1963	0.044	0.188	12	6	3	3945	0.087	0.377	15	5	2
2375	0.046	0.182	2	8	4	4761	0.091	0.364	4	3	1
Mittel 2041	0.048	0.183	7.7	10.2	5.8	4058	0.095	0.363	7.8	8.3	2.5

Tab. 10: Intensitäten von Na und K und Intensitätsquotienten von Na und K mit der Bremsstrahlung BS und mit Cl.
Dargestellt sind Mittelwerte und Variationskoeffizienten VK von je 3 Messungen desselben Schnitts in 20 Schnittten.

betragen die Variationskoeffizienten 11.7% für das Verhältnis Na/BS gegenüber 8.7% für den Quotienten Na/Cl und entsprechend 7.6% und 2.7% für die Quotienten K/BS bzw. K/Cl. In beiden Fällen ist der Quotient $Q(L/Cl)$ aus einer Linien- und der Cl-Intensität eine konstantere Größe als $Q(L/BS)$, der Quotient aus Linien- und Bremsstrahlungsintensität. Der Quotient $Q(L/BS)$ ermöglicht selbst in den homogenen Albuminstandards, unter Verwendung großer Rasterfelder und unter Einhaltung weitgehend derselben Meßgeometrie nur eine Quantifizierung, die bei Na eine Unsicherheit von 12% und bei K eine solche von 8% offenläßt.

Das gleiche Ergebnis zeigen die Messungen, die in Tab. 11 wiedergegeben sind. Hier wurden insgesamt 90 Schnitte der zwei verschiedenen Albuminstandards gemessen. Wieder ist der Variationskoeffizient des Quotienten $Q(L/Cl)$ für die Elemente Na, P und K mit 5.7, 4.0 und 2.9% deutlich kleiner als der des Quotienten $Q(L/BS)$ mit 8.1, 7.9 und 7.8%. Damit zeigt sich experimentell, daß die Quantifizierung über den Quotienten zweier Linienintensitäten genauere Ergebnisse bringt als über den Quotienten aus einer Linienintensität und der Bremsstrahlung.

Dieses Ergebnis kann am einfachsten durch unterschiedlich große, nicht probenspezifische Beiträge in einem Röntgenspektrum erklärt werden. Man kann annehmen, daß bei Verwendung kleinerer Rasterfelder die Inhomogenität der Probe stärker stört und der Quotient $Q(L/BS)$ noch stärker variiert, als bei den Messungen in dem verhältnismäßig homogenen Albuminstandard. Darum ist gerade für die Quantifizierung von Messungen in kleinen Volumina biologischer Proben das Quantifizierungsverfahren über den Quotienten von Linienintensitäten mithilfe eines internen Standards dem 'Peak-zu-Untergrund'-Verfahren von Hall vorzuziehen. Außerdem erlaubt die Methode des internen Standards, die Elementkonzentrationen pro FG zu berechnen, was nach dem Peak-zu-Untergrund-Verfahren wegen der Unkenntnis des (intrazellulär und je nach Zelltyp wechselnden) Trockengewichts nicht mit der nötigen Genauigkeit möglich ist.

Element	Standard	Intensität	I/BS	I/C1	VK(BS)	VK(C1)
Na	a	1952	0.045	0.177	8.2	5.0
	a	1976	0.050	0.179	6.6	4.8
	a	2067	0.044	0.178	5.8	4.8
	a	1985	0.047	0.176	5.4	6.3
	aa	3649	0.044	0.160	7.6	3.7
	b	2278	0.049	0.385	9.5	4.2
	b	2175	0.049	0.387	10.7	4.9
	b	2303	0.046	0.378	10.7	7.9
	bb	4432	0.050	0.358	8.7	10.2
					8.1	5.7
P	a	2286	0.052	0.207	6.9	3.2
	a	2240	0.057	0.203	6.3	4.1
	a	2369	0.051	0.204	11.1	5.4
	a	2313	0.055	0.205	8.1	3.5
	aa	4474	0.053	0.196	6.9	3.7
					7.9	4.0
K	a	4023	0.092	0.364	8.0	2.5
	a	3996	0.101	0.364	7.0	2.6
	a	4218	0.090	0.364	7.0	2.6
	a	4099	0.098	0.364	5.2	3.8
	aa	8261	0.099	0.362	5.9	2.2
	b	1938	0.042	0.324	12.8	3.1
	b	1802	0.041	0.320	10.8	3.8
	b	1954	0.039	0.322	7.5	3.6
	bb	4014	0.045	0.324	7.4	2.5
					7.8	2.9

Tab. 11: Mittelwerte der Intensitäten von Na, P und K, deren Quotienten mit der Bremsstrahlungs- (BS) und C1-Intensität, und die Variationskoeffizienten dieser Quotienten. Die Mittelwerte wurden aus Messungen von je 10 Schnitten mit einer Dicke von 0.75 bzw. 1.5 μm (aa und bb) gewonnen.

5.4 Serienschnittmethode

Die Quantifizierung über einen internen Standard ist nur möglich, wenn die Lösung des Standards vor dem Schockfrieren auf die Einfrieroberfläche aufgetragen werden kann. Das Verfahren eignet sich besonders gut bei Untersuchungen an frei zugänglichen Epithelien, wie z.B. Amphibienhäuten. Die Anwendung an Organen von Warmblütern ist dagegen nur beschränkt möglich. Das Freipräparieren der Organoberfläche kann zu Präparationsartefakten führen. Tiefer liegende Organstrukturen, wie z.B. das Nierenmark, können mit dieser Methode nicht quantitativ untersucht werden. Darum wurde ein anderes Quantifizierungsverfahren entwickelt, das mit Serienschnitten arbeitet.

Um die Unsicherheit in der Dicke eines Einzelschnitts zu verringern, werden beim Schneiden möglichst viele Schnitte nacheinander aufgenommen, sodaß die Unsicherheit in der Dicke der gesamten Schnittserie gleich groß ist, wie die maximale Variation der Dicke eines Einzelschnitts. Beträgt der maximale Fehler 0.5 µm bei einem Einzelschnitt, dann ergibt sich ein relativer Maximalfehler von nur 5% bei einer Serie von 10 Schnitten mit je 1 µm Dicke. Dieser Fehler liegt innerhalb der Meßgenauigkeit der Methode und kann toleriert werden.

Bei der Quantifizierung mithilfe von Serienschnitten wird einmal eine große Serie von Standardschnitten gemessen. Die Linienintensitäten aller Schnitte werden addiert und durch die Gesamtdicke D_s geteilt. Die Zahlenwerte Y_i

$$Y_i = C_i \cdot D_s / \sum_s I_{i,s} \quad (37)$$

geben den Quotienten aus Elementkonzentration C_i des Elements i und der zugehörigen Linienintensität eines 1 µm dicken Schnitts an. Nun werden in einer Serie von Schnitten der Probe gleiche Strukturen gemessen, z.B. Kerne proximaler Tubuli. Die Linienintensitäten der Probenspektren werden wieder addiert, durch die Gesamtdicke D_p aller Probenschnitte geteilt und mit dem Faktor Y multipliziert. Damit ergeben sich die Elementkonzentrationen in der gemessenen Struktur der Probe als

$$C_i = \sum_p I_{i,p} / D_p \cdot Y_i \quad (38)$$

Die Zahlenwerte Y_i müssen nur einmal bestimmt werden. Sie können sich jedoch von einem Meßtag zum anderen ändern, wenn zwischenzeitlich die Geometrie zwischen Detektor und Probe verändert wurde. Die Reproduzierbarkeit der Methode wird in Tab. 12 demonstriert. Mit der Serie 1 von insgesamt 90 μm Dicke wurden die Werte Y_i bestimmt. Die 'berechneten' Konzentrationen dieser Schnittserie sind darum definitionsgemäß die des Standards 'a' (Tab. 9). An verschiedenen Meßtagen wurden dann die Serien 2 bis 13 mit Gesamtdicken zwischen 5 und 20 μm gemessen, deren Konzentrationen mit den einmal bestimmten Werten von Y_i berechnet wurden.

Es zeigt sich, daß die Elementkonzentrationen max. um nur 10% falsch bestimmt werden, wenn die Werte Y_i nur einmal bestimmt werden. Werden diese Werte jedoch an jedem Meßtag mit einer Serie von 10 bis 15 Schnitten neu berechnet, dann kann der mögliche Fehler um etwa einen Faktor 2 noch verkleinert werden.

Bei der Quantifizierung mithilfe von Serienschnitten steigt die Zahl der benötigten Messungen an. Wenn über 10 Schnitte gemittelt wird, sind für die Messung von 10 verschiedenen Strukturen 100 Einzelmessungen nötig. Bei der Quantifizierung mithilfe eines internen Standards sollten etwa 30% der Messungen in dem Standard vorgenommen werden, sodaß mit 100 Einzelmessungen etwa 70 verschiedene Strukturen gemessen werden können. Allerdings wird bei der Methode der Serienschnitte durch die vorangegangene Addition der Einzelintensitäten der statistische Fehler des 'Meßwerts' einer Struktur stark verringert. Erst das Mittel aus 3 bis 4 Einzelmessungen mithilfe eines internen Standards ergibt statistisch gleich gesicherte Ergebnisse wie ein Meßwert nach der Serienschnittmethode. Damit liegt die Zahl der nötigen Einzelmessungen nur ungefähr doppelt so hoch wie bei der Methode mit einem internen Standard. Die Quantifizierung mit Serienschnitten stellt darum für die Messung oberflächenferner Gewebestrukturen ein brauchbares Verfahren dar, das mit vertretbarem Aufwand genaue Konzentrationsbestimmungen in Zellen ermöglicht.

Standard	Serie	Dicke (μm)	Elementkonzentrationen (mM)			
			Na	P	Cl	K
a	1	90	95	34	150	49
a	2	10	102	33	145	48
	3	11	89	33	139	45
	4	8	96	34	154	45
	5	5	101	34	149	48
	6	8	98	36	152	49
	7	5	96	33	151	49
			97 $\pm$ 5	34 $\pm$ 1	148 $\pm$ 6	47 $\pm$ 2
b	8	21	109	5	82	24
	9	6	99	3	63	19
	10	7	119	7	91	27
	11	9	100	5	76	23
	12	5	112	4	74	22
	13	10	96	3	61	18
			106 $\pm$ 9	5 $\pm$ 1	75 $\pm$ 11	21 $\pm$ 7

Tab. 12: Elementkonzentrationen in Schnittserien der Albuminstandards a und b. Diese Serien wurden an verschiedenen Meßtagen (mit möglicherweise veränderter Geometrie zwischen Detektor und Probe) gemessen.

Intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen in der Rattenniere

6 Experimentelle Ergebnisse

6.1 Untersuchungsmaterial

Mit der Methode der EMA und der Quantifizierung sowohl über einen internen Standard wie auch über Serienschnitte wurden die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen in der Rattenniere unter normalen Funktionsbedingungen geprüft. Die Versuche wurden an männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Alter von 8 bis 10 Wochen und einem Gewicht von etwa 2 N vorgenommen. Die Tiere wurden über 2 bis 3 Wochen im Institut mit Standarddiät Altromin C ernährt und hatten freien Zugang zu Trinkwasser (Leitungswasser). Vor der Entnahme der Nieren wurden die Tiere mit Inaktin, 1 mg/kg KG, narkotisiert. Insgesamt wurden die Nieren von 14 Ratten untersucht, und von 24 verschiedenen Gewebeproben wurden über 400 Dünnschnitte hergestellt und analysiert.

6.2 Präparation

Die Nieren der Ratten wurden auf zwei verschiedene Weisen gewonnen. Bei der operativen Technik wurden die Nieren in situ schockgefroren, nachdem zuvor die Nierenoberfläche mit einem Albuminstandard überzogen worden war, während bei der Schußmethode ein Gewebezylinder aus dem gesamten Tierkörper herausgeschnitten und unmittelbar nach dem Schuß schockgefroren wurde. Nach dem Schockfrieren wurde das Gewebe gefriereschnitten und gefriergetrocknet, wie es in Teil 2.1 beschrieben ist.

In der Versuchsserie mit der operativen Technik wurden die Tiere narkotisiert und mit einem Flankenschnitt laparotomiert. Nach der Präparation der Niere aus dem Fett des Nierenlagers wurde eine Nierenschale aus Plexiglas unter die Niere geschoben. Anschließend wurde die Kapsel entfernt. Die Nierenoberfläche wurde mit einem dünnen Film einer Standardalbuminlösung bestrichen und durch Übergießen mit dem beschriebenen Propan-Isopentan-Gemisch in situ schockgefroren. Abb. 29 zeigt eine Niere in der Schale unmittelbar vor dem Schockfrieren.

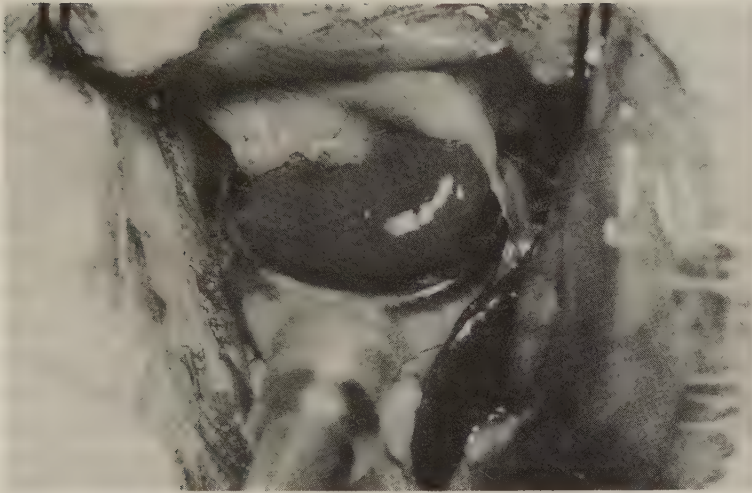


Abb. 29: Die Niere einer Ratte in der Nierenschale vor dem Schockfrieren

Während des Übergießens wurde das Organ aus der Bauchhöhle herausgebrochen und in das Gefäß mit der Kältemischung überführt. Nach etwa drei bis fünf Minuten wurde die Niere in ein anderes Gefäß mit flüssigem Stickstoff gebracht, aus der Schale entfernt und zerkleinert. Dann wurden geeignete Stücke mit der Einfrieroberfläche unter dem Schutz von flüssigem Stickstoff in den Präparatehalter eingespannt. Damit stand Nierengewebe mit einem internen Standard zur Verfügung.

Diese operative Entnahmetechnik wurde nach zwei etwas verschiedenen Protokollen durchgeführt. Bei dem einen Versuchsprotokoll wurde die Niere sofort nach dem Unterschieben der Schale schockgefroren. Bei dem zweiten Versuchsprotokoll wurde nach Abschluß der Operation die Nierenfunktion anhand der Ausscheidungsgrößen Harnzeitvolumen, Elektrolytkonzentration und Inulinclarence überprüft um sicherzustellen, daß die Niere einen normalen Funktionszustand hatte.

In der zweiten Versuchsserie wurden die betäubten Tiere unter einen Schußapparat gelegt, wie es in Abb. 30 A zu sehen ist. In Abb. 30 B sind einige Einzelheiten dieser Apparatur gezeigt. Ein umgebauter Bolzenschußapparat

der Firma Kerner ist in einem massiven Ständer eingespannt. In die Stirnseite des Bolzens ist die Hülse H eingeschraubt, die in vier Spitzen mit scharfen Schneiden ausläuft. Die betäubte Ratte liegt in einer Kunstharzschale auf einer Tischplatte mit zentraler Bohrung, unter der ein wärmeisoliertes Gefäß mit dem Kühlmittel K steht, das durch ein Bad aus flüssigem Stickstoff (N_2) auf 77.5 K gehalten wird. Beim Auslösen des Schusses

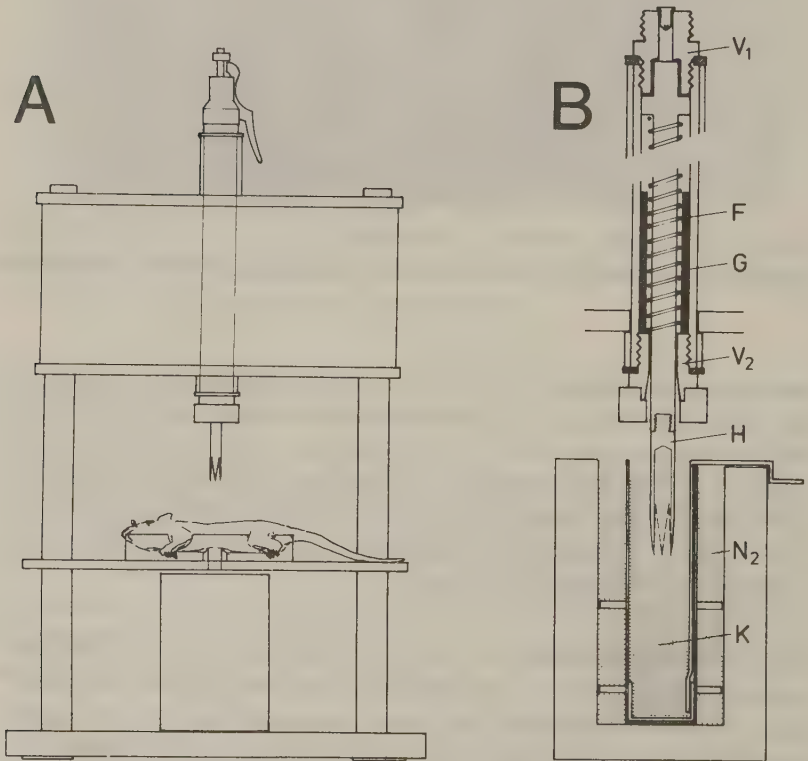


Abb. 30: Schußapparat zum Gewinnen eines Gewebezyinders.

A: Ständer mit Bolzenschußapparat, darunter eine Ratte

B: Einzelheiten des Bolzenschußapparats und des Kühlfäßes:

V₁ und V₂ Verschlussstücke, G Hartgummizylinder, F Feder, H Hülse mit zentraler Bohrung, vier Spitzen und Schneiden, N_2 flüssiger Stickstoff, K Kühlmittel zum Schockfrieren.

schneidet die Hülse aus dem gesamten Tierkörper einen runden Gewebezylinder heraus und taucht mit diesem Zylinder in das Gefäß mit dem Gefriermittel. Wenn sich die Hülse in der Kühlflüssigkeit befindet, stößt der Bolzen auf das Widerlager G aus Hartgummi und schnell zurück. Der Gewebezylinder verbleibt im Kühlmittel und wird sofort schockgefroren.

In Abb. 31 sind zwei Schnitte aus der Rinde der Rattenniere zu sehen. Der Schnitt A mit der oberflächlichen Albuminschicht stammt aus einer in situ schockgefrorenen Niere, B aus einer geschossenen Niere. Beide Schnitte sehen gleich aus, d.h. histologisch ist keine Alteration des geschossenen Gewebes durch die beim Schuß auftretenden Kräfte zu sehen. Diese Gewebeschonung wird durch die Form der Hülse erreicht. Die in Spitzen auslaufenden Schneiden bewirken, daß das Gewebe aus dem übrigen Tierkörper glatt herausgeschnitten wird, ohne daß die Oberfläche des Gewebezylinders gequetscht oder gezerrt wird. Hinten ist die Hülse geschlossen, so daß beim Eintritt des Gewebes die Luftsäule in der Hülse komprimiert wird, wodurch das Gewebe relativ sanft beschleunigt wird. Beim Anschlag des Bolzens auf dem Hartgummilager bewirken dann die Trägheit des Gewebes und der Druck der komprimierten Luft, daß das Gewebe die Hülse sofort verläßt, während diese zurückschnellt. Dadurch wird der Gewebezylinder unmittelbar nach dem Schuß durch den Tierkörper schockgefroren, und es treten keine intrazellulären Elektrolytveränderungen auf.

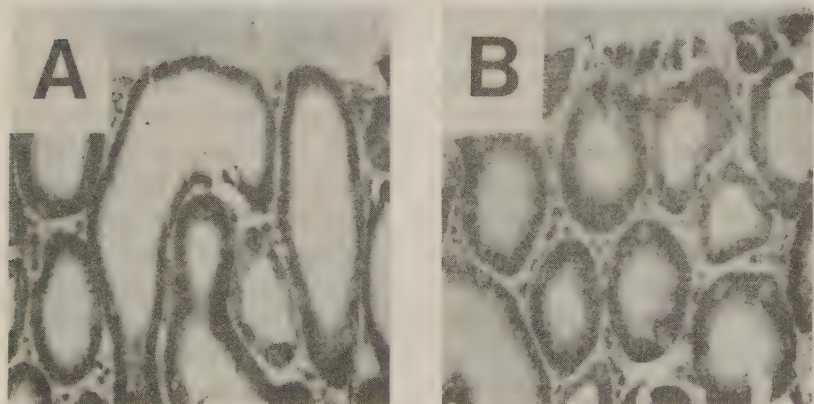


Abb. 31: Zwei Dünnschnitte aus dem Cortex der Rattenniere.
A in situ schockgefroren, B mit der Schußmethode gewonnen.

6.3 Meßtechnik

Wegen der besonderen Struktur der Zellen in Nierentubuli wurde bevorzugt in Zellkernen gemessen, wie es schon von uns beschrieben wurde / 5 /. Von elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Tubuluszellen ausgedehnte basolaterale Einfaltungen besitzen. Es ist zu erwarten, daß in diesen Strukturen ein extrazelluläres Elektrolytmilieu herrscht. Messungen basal oder benachbart zu Zellgrenzen werden darum keine reinen intrazellulären Werte ergeben, sondern können mehr oder weniger große Beimengungen extrazellulärer Flüssigkeit je nach dem Volumen der erfaßten extrazellulären Räume enthalten. An der luminalen Seite besitzen die Zellen im proximalen Tubulus einen tiefen Bürstensaum, in dem sich die Elektrolyte aus dem Tubuluslumen beim Gefriertrocknen niederschlagen. Darum ist auch in diesen Zellstrukturen mit einer Verfälschung der reinen intrazellulären Elektrolytwerte zu rechnen. Dagegen ist der Zellkern frei von extrazellulären Einfaltungen. Darum können in Kernen reine intrazelluläre Elektrolytwerte gemessen werden, wenn sichergestellt ist, daß der im Schnitt sichtbare Kern medial getroffen ist, d.h. wenn ebenso im vorausgegangenen wie auch im folgenden Schnitt Kernanteile zu erkennen sind.

Diese Überlegungen wurden experimentell geprüft, indem quer durch die Tubuluswand mit sehr kleinen, aufeinanderfolgenden Rasterfeldern von $0.5 \times 1 \mu\text{m}$ Größe gemessen wurde. Ein typisches Beispiel einer solchen Messung im proximalen und im distalen Tubulus zeigt Abb. 32. Wie erwartet liegen im proximalen und im distalen Tubulus basal noch verhältnismäßig hohe NaCl- und geringe K-Konzentrationen vor, die in der Zellmitte zu maximalen K-Werten ansteigen bzw. zu minimalen NaCl-Werten abfallen. Im proximalen Tubulus nimmt dann die NaCl-Konzentration zum Bürstensaum hin wieder stark zu, während die K-Konzentration abfällt. Dagegen bleiben im distalen Tubulus die in der Zellmitte gemessenen extremen Konzentrationen bis hin zur luminalen Zellgrenze weitgehend erhalten. Neben diesen Verteilungsmustern sind die Elektrolytkonzentrationen angegeben, die in benachbarten Zellkernen gemessen wurden. Hier werden etwa die gleichen Na- und K-Konzentrationen gemessen, wie im Cytosol, während die Cl-Konzentration geringfügig erniedrigt ist.

Dieses Elektrolytverteilungsmuster im Cytosol findet sich in allen Zellen gleichmäßig wieder. Es erscheint darum gerechtfertigt, intranukleäre Messungen von Na- und K-Konzentrationen als repräsentativ für das Cytosol zu betrachten, während mit den Cl-Werten im Kern zwar nicht die absoluten Werte im Cytosol, aber doch cytoplasmatische Änderungen der Cl-Konzentrationen erfaßt werden können. Eine Rechtfertigung für dieses Verfahren ergibt sich auch aus dem Befund, daß sich für Zellen anderer Organe, wie z.B. Amphibienepithel, für die eine Abgrenzung zwischen extra- und intrazellulären Räumen leicht möglich ist, ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede der Elektrolytzusammensetzung zwischen Kern und Cytosol ergeben /21/. Die Möglichkeit, in Kernen messen zu können, bedeutet eine große Vereinfachung der Analyse. Denn bei Messungen im Cytosol muß jeweils erst mit drei bis vier Einzelmessungen eine Stelle ermittelt werden, die durch extreme Elektrolytkonzentrationen die Annahme erlaubt, eine rein intrazelluläre Messung frei von extrazellulären Beimengungen vorgenommen zu haben.

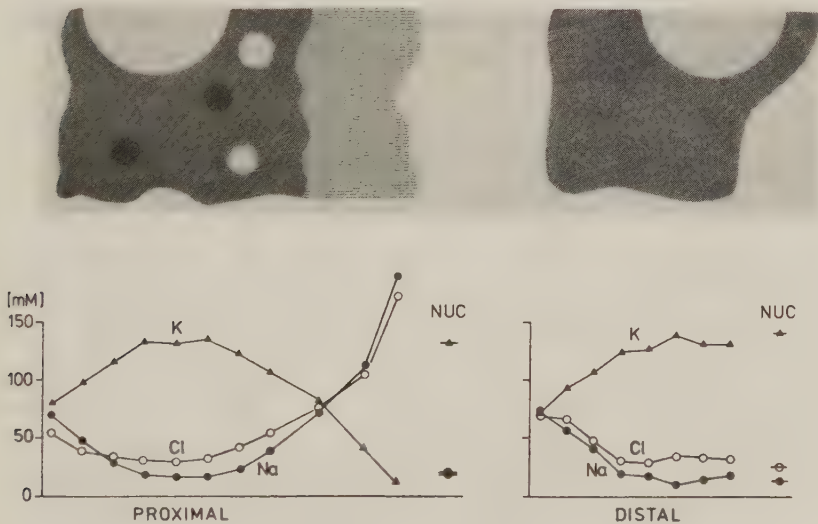


Abb. 32: Elektrolytkonzentrationen in proximalen und distalen Zellen kortikaler Tubuluszellen der Rattenniere (aus U. Bauer /4/).

6.4 Ergebnisse

Die Ergebnisse, die mithilfe der verschiedenen Präparationstechniken und Quantifizierungsverfahren erhalten wurden, sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben. Die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Daten zeigen in den einander entsprechenden Gewebestrukturen keine signifikanten Unterschiede, so daß diese Methoden hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und Exaktheit als äquivalent zu bezeichnen sind.

Drei Nieren wurden analysiert, deren Funktion nach dem Freipräparieren 60 Minuten lang überprüft wurde. Die in diesen Organen ermittelten Werte sind in Tab. 13 wiedergegeben. Die Quantifizierung erfolgte bei all diesen Nieren über einen internen Standard. Die Elementkonzentrationen betragen im Mittel für Na, Mg, P, Cl und K 21, 11, 163, 25 und 133 mM in Zellkernen proximaler Tubuli und entsprechend 10, 13, 194, 14 und 143 mM in Zellkernen distaler Tubuli.

Sechs Nieren wurden analysiert, die sofort nach dem Freipräparieren in situ schockgefroren wurden, ohne daß ihre Funktion überprüft wurde.

Gewebe	Niere	n	TG (%)	Elementkonzentrationen (mM)				
				Na	Mg	P	Cl	K
Nuc. prox.	6	7	26	23	11	154	22	129
	7	12	21	19	10	175	32	144
	8	32	22	20	12	159	20	125
	Mittel		23	21	11	163	25	133
Nuc. dist.	6	5	26	10	14	210	13	150
	7	7	22	10	13	182	14	133
	8	11	22	9	13	190	14	143
	Mittel		23	10	13	194	14	143

Tab. 13: Konzentrationen von Na, Mg, P, Cl und K in Zellkernen proximaler und distaler Tubuli des Cortex der Rattenniere. (Operative Methode, Nierenfunktion nach der Operation für 60 min überprüft).

Die in diesen Nieren gemessenen Elementkonzentrationen sind in Tab. 14 dargestellt. Bei beiden Präparationsmethoden ergeben sich innerhalb der Fehlergrenzen der Meßmethode praktisch die gleichen Konzentrationen für die Elektrolyte Na, Cl und K, für Mg und für den Matrixbestandteil P. Es scheint also für intrazelluläre Elektrolytmessungen ohne Belang zu sein, ob das Nierengewebe unmittelbar nach dem Freipräparieren sofort schockgefroren wird, oder ob nach der Operation so lange gewartet wird, bis das Organ wieder einen befriedigenden Funktionszustand erreicht hat.

Mit der Schußmethode wurden von fünf Nieren 15 verschiedene Gewebeproben gewonnen. Die Zuordnung der einzelnen Proben wurde anhand der Entfernung von der Nierenoberfläche und des morphologischen Bildes der einzelnen Schnitte nach dem in Abb. 33 gezeigten Schema vorgenommen. In diesem Schema wird dieselbe Nomenklatur verwandt, wie sie von Peter /44/ oder

Gewebe	Niere	n	TG (%)	Elementkonzentrationen (mM)				
				Na	Mg	P	Cl	K
Nuc. prox.	9	22	20	24	9	149	24	130
	10	25	25	23	6	153	19	139
	11	37	22	21	7	148	19	133
	12	16	23	19	10	169	21	125
	13	42	21	18	8	179	19	127
	14	17	26	20	7	162	23	136
	Mittel		24	21	8	160	21	132
Nuc. dist.	9	9	24	12	12	207	17	147
	11	12	23	9	8	184	15	140
	13	15	21	10	9	180	15	134
	Mittel		23	11	10	190	16	140

Tab. 14: Konzentrationen von Na, Mg, P, Cl und K in Zellkernen proximaler und distaler Tubuli des Cortex der Rattenniere.
(Operative Methode, Schockfrieren sofort nach der Operation).

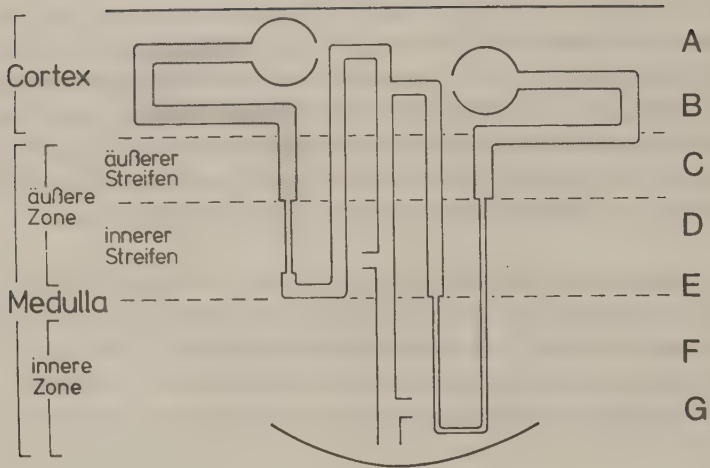


Abb. 33: Schema der Niere mit Aufteilung in verschiedene Schichten

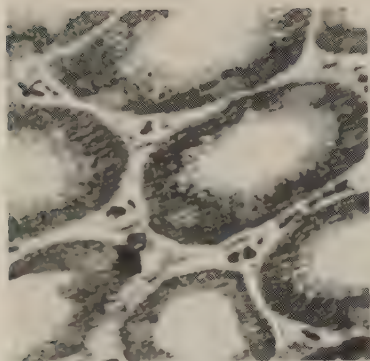
später von Kriz /35/ benützt wurde. Der Cortex der Niere zeichnet sich durch das Vorhandensein von oberflächlichen und tiefen Glomeruli aus (Schicht A und B). Die Medulla wird in eine äußere und eine innere Zone unterteilt. In der äußeren Zone wird weiter zwischen dem äußeren Streifen (Schicht C), der noch keine dünnen Anteil der Henle-Schleife enthält, und dem inneren Streifen (Schicht D und E) unterschieden, in dem dünne und dicke Anteile der Henle-Schleife gefunden werden. In der inneren Zone der Medulla (Schicht F und G) werden nur noch Sammelrohre und dünne Anteile der Henle-Schleife angetroffen.

Nächste Seite:

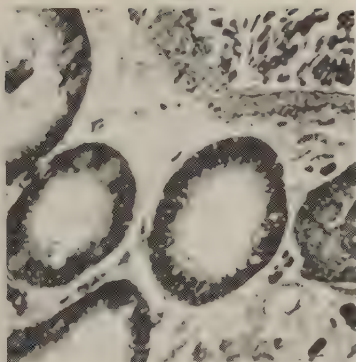
Abb. 34: Gefriergetrocknete Dünnschnitte ($0.75\ \mu\text{m}$) verschiedener Schichten der Rattenniere.

Die Ausschnitte A bis F entsprechen den Schichten A bis F des in Abb. 33 dargestellten Schemas.

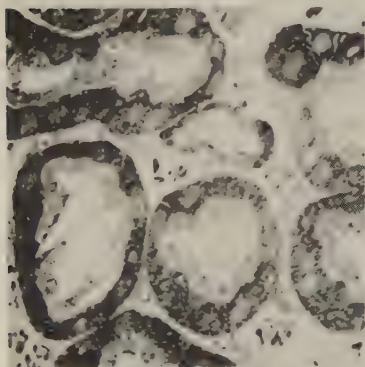
A



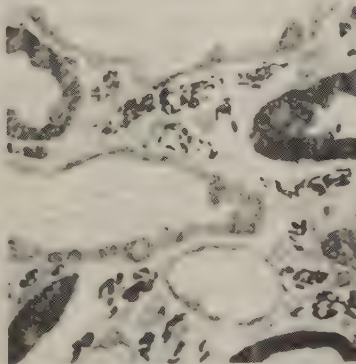
B



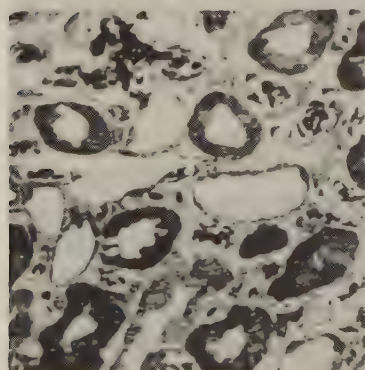
C



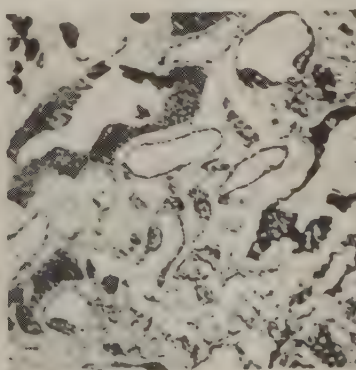
D



E



F



— 100 μ m —

In Abb. 34 sind sechs Ausschnitte von Dünnschnitten verschiedener Strukturen der Rattenniere gezeigt, die den Schichten des in Abb. 33 dargestellten Schemas entsprechen. In den Schichten A bis C können proximale Tubuli mit Bürstensaum von distalen Tubuli bzw. vom dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife unterschieden werden. Zusätzlich erkennt man in B am unteren Bildrand einen angeschnittenen Glomerulus und am oberen Bildrand ein mit Erythrozyten gefülltes Gefäß. In den Schnitten der Schichten D und E können die vielen dunklen, dickwandigen Tubulusquerschnitte als dicke Anteile der aufsteigenden Henle-Schleife und die elektronenoptisch transparenteren, großlumigen Tubulusquerschnitte mit den weit ins Lumen vorgebuchteten Kernen als Anschnitte von Sammelrohren differenziert werden. Zwischen diesen Strukturen finden sich Querschnitte des dünnen Teils der Henle-Schleife und viele kleine Blutgefäße. In dem Schnitt aus der Schicht F werden neben Blutgefäßen nur noch Sammelrohre und dünne Anteile der Henle-Schleife angetroffen, wobei in dieser Schicht morphologisch nicht mehr zwischen auf- und absteigendem Teil der Henle-Schleife unterschieden werden kann.

In den Tab. 15 A bis E sind die Elementkonzentrationen für Na, Mg, P, Cl und K angegeben, die in den Strukturen proximaler Tubulus, Henle-Schleife, distaler Tubulus und Sammelrohr in verschiedenen Schichten der Niere gemessen wurden. Dargestellt sind alle 'Einzelwerte' von Messungen in Zellkernen, die mit der Serienschchnittmethode nach Summation über eine wechselnd große Zahl von Schnitten erhalten wurden. Der Vergleich einzelner Meßwerte in entsprechenden Strukturen verdeutlicht, wie gering bei einer Quantifizierung über Serienschritte die Streuung der einzelnen Meßwerte ist.

Die aus diesen Werten gebildeten Mittelwerte sind in Tab. 16 wiedergegeben. Die Konzentrationen für Na, Mg, P, Cl und K betragen in der obersten Schicht A im proximalen Tubulus 20, 4, 142, 15 und 134 mM und im distalen Tubulus 4, 8, 178, 13 und 152 mM. Sie stimmen damit sehr gut mit den Konzentrationen überein, die nach operativer Freipräparation der Niere und Schockfrieren in situ erhalten werden. Diese betragen (gemittelt aus Tab. 13 und 14) proximal 21, 9, 161, 23 und 132 mM und distal 10, 11, 192, 15 und 141 mM. Diese gute Übereinstimmung ist neben dem histologischen Bild der Schnitte ein weiterer Hinweis, daß die Schußmethode eine gute Vitrifizierung beliebiger Gewebeschichten ermöglicht.

Nieren- schicht	Niere Nr	Gesamt- dicke(µm)	TG %	Konzentration				
				Na	Mg	(mMol / kg FG)		
						P	Cl	K
A	1	3.0	26	16	4	131	17	130
		3.0	24	20	3	138	19	133
	2	3.7	24	18	4	159	11	150
		5.3	23	21	6	152	13	147
		6.8	21	22	6	152	13	135
		5.3	22	20	5	151	13	136
		5.3	21	18	5	147	15	138
		4.5	20	18	5	142	12	135
	3	3.0	19	22	5	122	14	126
		3.7	22	20	4	133	16	128
		4.5	19	19	5	117	13	135
	4	3.7	29	24	3	152	18	129
		3.7	26	28	3	152	17	123
BC	4	4.5	26	28	4	160	13	130
		6.0	26	26	5	145	14	123
		5.2	26	21	3	157	13	133
		6.0	25	25	4	161	14	130
C	1	3.7	26	14	9	156	23	117
		4.5	25	16	9	154	24	119
		4.5	23	11	5	138	16	131
	2	3.7	24	12	8	134	19	122
		3.7	31	9	5	177	24	119
		4.5	24	12	10	164	18	123
		6.8	26	13	8	158	21	123

Tab. 15 A: Elementkonzentrationen in Zellkernen des proximalen Tubulus in verschiedenen Schichten (vergl. Abb. 33) der Rattenniere.

Nieren- schicht	Niere Nr	Gesamt- dicke(μm)	TG %	Konzentration (mMol / kg FG)				
				Na	Mg	P	Cl	K
A	1	3.7	23	6	6	150	17	144
		3.0	22	6	11	191	11	155
	2	3.0	21	3	7	178	10	145
		4.5	20	5	8	180	14	150
		4.5	23	3	7	193	13	161
BC	4	3.7	25	13	12	196	9	140
		3.7	26	13	9	226	9	151
		4.5	26	14	12	213	10	143
		3.7	25	10	8	235	8	145
C	1	3.7	22	6	7	168	21	148
		3.0	22	7	7	169	20	142
		3.7	20	8	10	155	18	133
D	4	5.3	22	10	10	187	18	151
		7.5	22	8	8	176	18	143
		7.5	22	13	11	180	20	145
		6.8	21	11	10	171	19	143
		6.0	23	11	9	171	24	142
	5	6.0	23	12	11	178	23	149
		6.7	25	12	9	205	30	158
		6.0	24	11	8	203	28	150
E	1	4.5	22	15	6	167	54	134
		4.5	24	15	5	184	49	138
	4	3.0	26	14	8	173	46	131

Tab. 15 B: Elementkonzentrationen in Zellkernen des distalen Tubulus (Schicht A und BC) und des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife (Schicht C bis E) in der Rattenniere.

Nieren- schicht	Niere Nr	Gesamt- dicke(µm)	TG %	Konzentration		(mMol / kg FG)		
				Na	Mg	P	Cl	K
C	1	5.3	20	12	10	152	21	133
		4.5	22	8	8	142	37	129
		3.0	25	10	11	162	22	137
D	4	4.5	20	8	4	148	47	156
		4.5	22	11	6	147	44	153
		3.7	21	11	4	159	58	152
	5	4.5	23	9	5	154	45	145
		3.7	23	10	4	152	53	142
F	3	6.8	26	19	8	260	52	125
		7.5	27	22	4	286	51	123
		4.5	26	17	5	287	48	128
	4	5.3	28	20	6	296	56	132
		5.3	30	22	5	323	70	147
		5.3	27	15	6	287	53	137
		5.3	27	10	7	289	41	142
		5.3	28	17	4	282	55	134
		6.0	29	14	7	268	51	127
	5	4.5	25	16	7	265	50	122
		4.5	28	13	7	277	49	134
G	5	3.7	22	156	2	155	182	84
		3.0	23	168	3	174	190	86
		3.0	21	163	3	176	174	83

Tab. 15 C: Elementkonzentrationen in Zellkernen des Sammelrohrs in verschiedenen Schichten der Rattenniere.

Nieren- schicht	Niere Nr	Gesamt- dicke(µm)	TG %	Konzentration		(mmol / kg FG)		
				Na	Mg	P	Cl	K
D	4	3.0	21	71	3	144	74	126
E	1	2.3	22	175	2	177	159	85
		1.5	20	94	2	148	98	103
		2.3	20	108	1	161	102	96
F	4	4.5	26	205	1	239	191	79
		4.5	21	235	1	171	210	49
		4.5	22	228	3	189	206	52
G	5	3.0	22	319	1	159	310	56

Tab. 15 D: Elementkonzentrationen in Zellkernen des dünnen Teils der Henle-Schleife (auf- und absteigend) in den Schichten D bis G.

Nieren- schicht	Niere Nr	Gesamt- dicke(µm)	TG %	Konzentration		(mmol / kg FG)		
				Na	Mg	P	Cl	K
A	1	3.0	6	140	1	16	121	15
	2	1.5	4	128	1	17	97	16
		2.3	4	109	2	20	96	24
F	3	4.5	11	188	1	46	165	24
	4	4.5	9	196	1	24	173	22
		5.3	10	187	1	22	162	23
		5.3	9	187	0.2	17	157	20
G	5	2.3	8	233	0	12	190	14
		3.0	9	329	0	13	277	16

Tab. 15 E: Elementkonzentrationen im Extrazellulärraum (Schicht A) und im Interstitium in den Schichten F und G der Rattenniere.

Gewebe- struktur	Schicht	K o n z e n t r a t i o n e n					(mMol / kg FG)	
		Na	Mg	P	Cl	K		
proximaler Tubulus	A	20 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	142 $\pm$ 13	15 $\pm$ 3	134 $\pm$ 8		
	B	25 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	156 $\pm$ 7	14 $\pm$ 1	129 $\pm$ 4		
	C	13 $\pm$ 2	8 $\pm$ 2	154 $\pm$ 15	21 $\pm$ 3	122 $\pm$ 5		
Henle- schleife, dünn, ab- und auf- steigend	D	71	3	144	74	126		
	E	125 $\pm$ 40	2 $\pm$ 1	162 $\pm$ 15	120 $\pm$ 34	95 $\pm$ 10		
	F	223 $\pm$ 15	1 $\pm$ 1	200 $\pm$ 36	202 $\pm$ 10	60 $\pm$ 17		
	G	320	1	159	310	56		
Henle- schleife, dick	E	15 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	175 $\pm$ 9	50 $\pm$ 4	133 $\pm$ 3		
	D	11 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	181 $\pm$ 11	22 $\pm$ 4	146 $\pm$ 4		
	C	7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	164 $\pm$ 8	20 $\pm$ 2	141 $\pm$ 7		
distaler Tubulus	B	12 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	218 $\pm$ 17	9 $\pm$ 1	145 $\pm$ 5		
	A	4 $\pm$ 2	8 $\pm$ 2	178 $\pm$ 17	13 $\pm$ 3	152 $\pm$ 7		
Sammel- rohr	C	10 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	147 $\pm$ 7	29 $\pm$ 12	131 $\pm$ 3		
	D	10 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	152 $\pm$ 5	49 $\pm$ 6	150 $\pm$ 6		
	F	17 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	284 $\pm$ 18	52 $\pm$ 7	132 $\pm$ 8		
	G	162 $\pm$ 6	3 $\pm$ 1	168 $\pm$ 12	182 $\pm$ 8	85 $\pm$ 2		

Tab. 16: Elementkonzentrationen in verschiedenen Strukturen und Schichten der Rattenniere (die Zuordnung der Schichten A bis G zu der üblichen Einteilung ist in Abb. 33 erklärt).

Die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen von Na, Cl und K sind in Abb. 35 als Konzentrationsprofile über den Verlauf des gesamten Tubulus synoptisch zusammengestellt. Die Na-Konzentration bleibt im Verlauf des gesamten proximalen Konvoluts verhältnismäßig konstant mit Werten zwischen 20 bis 25 mMol/kg FG. Im absteigenden Teil des proximalen Tubulus im äußeren Streifen der Medulla nimmt die Na-Konzentration um ungefähr 50% auf 10 bis 15 mMol/kg FG ab. Im Verlauf der Henle-Schleife steigt sie auf Werte über 300 mMol/kg FG in der inneren Zone der Medulla an, wobei aufgrund unserer Präparation bisher keine Unterscheidung zwischen dünnem ab- und aufsteigendem Teil der Schleife möglich war. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im distalen Tubulus liegt die Na-Konzentration mit Werten zwischen 5 und 15 mMol/kg FG niedriger als im proximalen Tubulus. Auch im Sammelrohr werden solch niedrige Werte bis weit in die innere Zone der Medulla hinein gefunden. Erst in den tiefsten papillären Schichten der Medulla steigt die intrazelluläre Na-Konzentration bis auf etwa 150 mMol/kg FG an.

Sehr ähnlich verhält sich die intrazelluläre Cl-Konzentration. Von sehr niedrigen Werten um 15 bis 20 mMol/kg FG im proximalen Tubulus steigt sie im Verlauf des dünnen Teils der Henle-Schleife etwa gleichmäßig wie die Na-Konzentration auf Werte bis 300 mMol/kg FG in der inneren Zone der Medulla an, und geht dann wieder auf Werte zwischen 10 bis 20 mMol/kg FG im distalen Tubulus zurück. Im Sammelrohr liegen über weite Strecken bis hin in die innere Zone der Medulla Konzentrationen zwischen 30 und 50 mMol/kg FG vor, die (wie die Na-Konzentration) erst in der Papille auf Werte über 150 mMol/kg FG ansteigen. Insgesamt verlaufen die Na- und Cl-Konzentrationen ungefähr parallel, wobei jedoch auffällt, daß im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und im Sammelrohr die Cl-Konzentration jeweils um 10 bis 30 mMol/kg FG höher als die entsprechende Na-Konzentration liegt.

Die K-Konzentration zeigt in ihrem Verlauf ein inverses Verhalten zur Na- bzw. Cl-Konzentration. Von Werten zwischen 125 und 135 mMol/kg FG proximal fällt sie auf etwa 60 mMol/kg FG im dünnen Teil der Henle-Schleife der inneren Medulla ab. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, im distalen Tubulus und im Sammelrohr liegt sie wieder

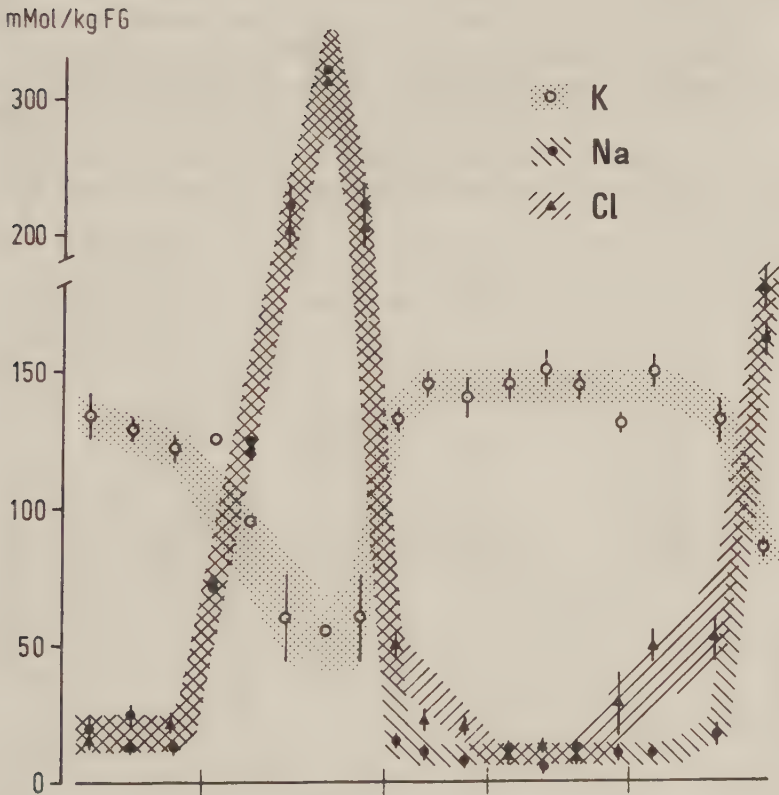
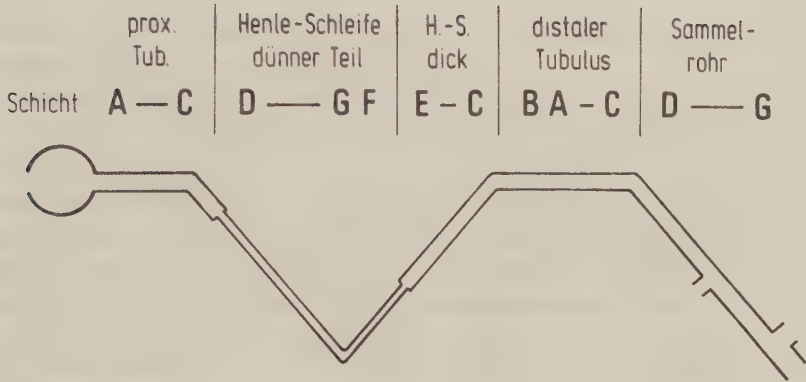


Abb. 35: Intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen (mMol/kg FG) von Na, Cl und K über den Verlauf des gesamten Tubulus. (Die Angabe der Schichten A bis F entspricht dem Schema in Abb. 33).

Schicht	Struktur	Na	Mg	P	Cl	K	Na+K
A + B	prox. Tub., Nucleus	22 ± 4	4 ± 1	149 ± 11	15 ± 2	132 ± 7	154
	Cytosol, medial	23 ± 6	3 ± 1	170 ± 16	25 ± 7	130 ± 10	153
	Cytosol, basal	60 ± 11	3 ± 2	125 ± 21	50 ± 10	85 ± 11	145
	Interstitium	126 ± 16	1 ± 1	18 ± 5	105 ± 14	18 ± 5	144
C	prox. Tub., Nucleus	13 ± 2	8 ± 2	154 ± 15	21 ± 3	122 ± 5	135
	Cytosol, medial	10 ± 3	6 ± 2	190 ± 20	25 ± 5	125 ± 8	135
	Cytosol, basal	50 ± 8	5 ± 2	140 ± 21	50 ± 9	90 ± 11	140
	Sammelrohr, Nucleus	10 ± 2	9 ± 1	147 ± 7	29 ± 12	131 ± 3	141
	Cytosol, medial	10 ± 3	10 ± 2	195 ± 11	30 ± 14	130 ± 5	140
	Cytosol, basal	30 ± 7	10 ± 3	160 ± 15	45 ± 16	120 ± 8	150
F	Sammelrohr, Nucleus	17 ± 4	6 ± 2	284 ± 18	52 ± 7	132 ± 8	149
	Cytosol, medial	15 ± 5	5 ± 2	260 ± 21	60 ± 7	135 ± 8	150
	Cytosol, med/bas	110 ± 12	5 ± 2	230 ± 23	110 ± 10	110 ± 12	220
	Cytosol, basal	210 ± 27	5 ± 2	210 ± 25	201 ± 26	105 ± 14	315
	Interstitium	190 ± 28	1 ± 1	27 ± 5	164 ± 21	22 ± 5	212

Tab. 17: Elektrolytkonzentrationen (mmol/kg FG) in verschiedenen Schichten und Strukturen der Ratteniere.

zwischen 130 und 150 mMol/kg FG, um erst im papillären Teil des Sammelrohrs auf Werte unter 90 mMol/kg FG abzusinken.

In Tab. 17 sind Messungen im Nucleus, im Cytosol und im Interstitium in verschiedenen Strukturen und Schichten der Niere einander gegenübergestellt. Wie in Teil 6.3 erwähnt wurde, stimmen die Elementkonzentrationen im Nucleus und im umgebenden Cytosol weitgehend überein, wenn von drei oder vier Cytosolmessungen diejenigen ausgewählt werden, die die höchsten K- und die niedrigsten Na-Konzentrationen aufweisen. Messungen in basalen Anteilen einer Zelle ergeben dagegen immer einen Übergangswert zwischen rein intrazellulären und extrazellulären Werten ('Interstitium' in Tab. 17). Bei diesen Daten fällt auf, daß die Summe aus Na- und K-Konzentrationen, die im basalen Cytosol des Sammelrohrs in der inneren Medulla (Schicht F) gemessen wurden, einen höheren Wert ergibt als im Nucleus oder im umgebenden Interstitium während in den übrigen Schichten die Summe aus Na- und K-Konzentrationen überall intra- und extrazellulär ungefähr gleich hoch ist.

7 Diskussion

Bestimmungen des intrazellulären Elektrolytgehalts verschiedener Zellen der Niere sind bisher unter unterschiedlichen Aspekten durchgeführt worden. Das Ziel dieser Untersuchungen war die Aufklärung grundlegender aktiver Transportmechanismen, der Regulation des Zellvolumens, der tubulären Sekretions- und Resorptionsmechanismen und des Konzentrationsmechanismus der Niere. Dabei wurden Elektrolytaktivitäten und Potentialdifferenzen mithilfe von Mikroelektroden /25, 33, 38, 47, 55, 59, 60, 61/ und Elektrolytkonzentrationen mit chemischen und radiochemischen Methoden /8, 9, 33, 48, 60/ bestimmt.

Die Untersuchungen, die bisher von einigen anderen Gruppen /37, 39/ mithilfe der EMA an der Niere durchgeführt wurden, lassen im Wesentlichen nur Aussagen über vorliegende Konzentrationsprofile innerhalb der Niere zu. Wegen der verwendeten Präparationstechniken (dicke Präparate) und fehlender oder mangelhafter Quantifizierungsverfahren konnten diese Untersuchungen keinen Aufschluß über die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen liefern. Von Kriz et al. /36/ wurden zwar Absolutwerte angegeben, wobei aber von den Autoren selbst Zweifel an der Zuverlässigkeit des verwendeten Quantifizierungsverfahrens geäußert wurden. Außerdem waren die Schnitte mit 7 μm so dick und die Meßpositionen so gewählt, daß neben intrazellulären auch extrazelluläre Kompartimente mit angeregt wurden.

In dieser Arbeit werden quantitative Daten intrazellulärer Elektrolytkonzentrationen für verschiedene Abschnitte des Nephrons wiedergegeben, wie sie in der intakten Niere gefunden werden. Es wird diskutiert, inwieweit diese neuen Daten unser vorhandenes Wissen über die Funktion der Niere bestätigen bzw. erweitern.

7.1 Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren

In Tab. 18 werden die vorliegenden Ergebnisse den Daten anderer Autoren gegenübergestellt. Auf einen Vergleich mit Befunden, die mit ionensensitiven Mikroelektroden erhoben wurden, ist dabei bewußt verzichtet worden, da sich die mit dieser Methode gewonnenen Elektrolytaktivitäten wegen der niedrigen Aktivitätskoeffizienten deutlich von den zellulären Konzentrationen unterscheiden /34/. Sowohl die Analyse größerer Gewebestücke von Ruiz-Guinazu et al. /48/, von Khuri et al. /33/, von Sullivan /55/ oder von Grantham et al. /27/ und die Analyse diszezierter Nephronabschnitte von Burg und Orloff /8/, als auch die von Kriz et al. /36/ mit der EMA erhaltenen Daten liefern höhere intrazelluläre Na-Konzentrationen zwischen 35 und 80 mMol/kg FG und meist niedrigere K-Konzentrationen zwischen 63 und 136 mMol/kg FG, verglichen mit den hier vorgelegten Daten von 20 bzw. 136 mMol/kg FG.

Gewebe	Na	K	Na+K	Referenz
chemische Analyse:				
Hundeniere	60	63	123	/48/
Kaninchenniere	49	75	124	/ 8 / *)
Amphiuma-Niere	45	98	143	/55/ **)
Rattenniere		136		/33/
Kaninchenniere	31	125	158	/27/
EMA:				
Rattenniere	80	105	185	/36/ ***)
Rattenniere	20	136	156	diese ***)
				Arbeit

Tab. 18: Elektrolytkonzentrationen (mMol/kg FG) in Nierengewebe, mit chemischen Methoden bzw. mithilfe der EMA bestimmt.

*) Annahme: 80% proximale, 20% distale Tubuli, Trockengewichtsanteil 30% des Feuchtgewichts

**) Konzentrationen in mMol/l Zellwasser, nur distale Tubuli

***) Annahme: 80% proximale, 20% distale Tubuli

Die Diskrepanz zwischen den hier vorgelegten deutlich niedrigeren Na-Konzentrationen und den zitierten Daten der chemischen Analyse muß damit erklärt werden, daß - wie in der Einleitung schon erwähnt wurde - die Bestimmung des extrazellulären Volumens durch geeignete Markierungssubstanzen nicht mit der nötigen Genauigkeit möglich ist. Offensichtlich wird dabei in einer chemischen Gesamtanalyse der Anteil des extrazellulären Volumens zu niedrig bestimmt /21, 22/. Dadurch wird bei der Berechnung der intrazellulären Konzentrationen dem intrazellulären Raum fälschlicherweise ein extrazellulärer Anteil mit hoher Na- und niedriger K-Konzentration zugerechnet. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die prozentuale Abweichung der Summe aus Na- und K-Konzentrationen bei den verschiedenen Bestimmungsmethoden weniger stark streut als die Angabe der einzelnen Konzentrationen. Sie beträgt im kortikalen Epithel 156 mMol/kg FG und variiert bei den Messungen der anderen Autoren zwischen 123 und 158 mMol/kg FG.

Von Kriz et al. /36/ wurden mit der EMA Daten bestimmt, die für Na mit 80 mMol/kg FG deutlich höher und für K mit 105 mMol/kg FG niedriger liegen, als die von uns bestimmten Konzentrationen. Wie weiter oben schon erwähnt wurde, lassen sich diese Abweichungen wahrscheinlich dadurch erklären, daß jene Autoren ein unzulängliches Quantifizierungsverfahren verwendet haben, und daß bei diesen Messungen auch extrazelluläre Räume mit erfaßt wurden.

Die deutlichen Unterschiede der in Tab. 18 einander gegenübergestellten Daten können auch nicht durch Artefakte erklärt werden, die im Verlauf der von uns verwendeten Präparation und bei der Messung auftreten könnten. Eine Verfälschung unserer Meßergebnisse könnte dadurch zustande kommen, daß sich die im intra- und extrazellulären Raum vorhandenen unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen durch Diffusion einander angleichen, oder daß sich Elektrolyte aus dem extrazellulären Raum an zelluläre Strukturen anlagern und dann bei der Messung mit angeregt werden. Sollten diese Artefakte von Bedeutung sein, dann müßte man jedoch annehmen, daß die von uns bestimmten Na-Konzentrationen eher noch etwas zu hoch und die K-Konzentrationen etwas zu niedrig liegen könnten, da diese Artefakte zu erhöhten Na- und erniedrigten K-Konzentrationen führen müßten. Allerdings läßt, wie U. Bauer gezeigt hat /4/, der Verlauf der Konzentrationsprofile über die Ausdehnung einer Zelle

(vergl. Abb. 32) den Schluß zu, daß eventuelle Diffusionsvorgänge keine große Bedeutung besitzen. Dies geht vor allem aus den Messungen am distalen Tubulus hervor, in dem auf der luminalen Seite keine ausgeprägten extrazellulären Kompartimente vorkommen. In diesem werden bis zur luminalen Zellgrenze hin gleichbleibend niedrige NaCl- und hohe K-Konzentrationen gefunden.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß lange Abschnitte des Tubulus und das Sammelrohr bis weit in die innere Medulla hinein konstant niedrige NaCl- und hohe K-Konzentrationen besitzen. Diese Daten stimmen gut mit den qualitativen Befunden von Koepsell et al. /37/ und von Lechene und Bonventre /39/ überein. Auch die von diesen Autoren angegebenen relativen Konzentrationen steigen, verglichen mit den Werten im Kortex, bis in die innere Medulla nur wenig an, um erst in der Papille exponentiell anzuwachsen.

7.2 Unterschiede zwischen Zellen im proximalen und im distalen Tubulus

Nach unseren heutigen Kenntnissen haben der proximale und der distale Tubulus eine ganz verschiedene Funktion /26/. Der proximale Tubulus, der für Wasser und Ionen verhältnismäßig gut permeabel ist, hat seine wesentliche Aufgabe darin, den mengenmäßig größten Teil des glomerulären Filtrats (70 bis 80%) isoton rückzuabsorbieren /25, 58, 61/. Dagegen ist der distale Tubulus aus einem 'dichten' Epithel aufgebaut, dessen Funktion weniger die Resorption großer Flüssigkeitsmengen, als vielmehr die Regulation der Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit ist /33, 55/. Diese unterschiedliche Funktion scheint sich auch in Unterschieden in der intrazellulären Elektrolytzusammensetzung wiederzuspiegeln. Besonders auffällig sind die unterschiedlichen Na-Konzentrationen, die mit 4 bis 12 mMol/kg FG im distalen Tubulus nur halb so hoch sind wie im kortikalen Anteil des proximalen Tubulus mit 20 bis 25 mMol/kg FG. Umgekehrt liegen im distalen Tubulus die Mg-Konzentration um etwa 5, die K-Konzentration um 10 bis 20 und der Gehalt an P um 20 bis 50 mMol/kg FG höher als im proximalen Tubulus, wobei aufgrund der Methode bei dem P-Gehalt nicht zwischen anorganischem und organisch gebundenem P unterschieden werden kann.

7.3 Elektrolytkonzentrationen im Epithel des dünnen Teils der Henle-Schleife

Bei einem Vergleich der intrazellulären Elektrolytkonzentrationen (Tab. 16) in den verschiedenen Nephronabschnitten fällt auf, daß in allen aktiv transportierenden Epithelien wie proximaler und distaler Tubulus, dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife und Sammelrohr sehr niedrige Na-Konzentrationen von 25 mMol/kg FG oder weniger vorkommen. Erst papillennah steigt in der Schicht G die Na-Konzentration im Sammelrohr auf über 150 mMol/kg FG an. Dagegen konnten im dünnen Teil der Henle-Schleife keine solch niedrigen Na-Konzentrationen gefunden werden. Hier nimmt die Na-Konzentration in den Schichten D bis F kontinuierlich von 70 auf über 200 mMol/kg FG zu, während sie im benachbarten Sammelrohr konstant unter 20 mMol/kg FG liegt. Dieses Ergebnis, daß die Na-Konzentration im dünnen Teil der Henle-Schleife erhöht ist, könnte ein Hinweis dafür sein, daß die Zellen dieses Epithels einen weniger stark auswärts gerichteten Na-Transport aufweisen.

Dieser Befund steht in Einklang mit Messungen anderer Autoren /31, 38, 49/, die im dünnen Teil der Henle-Schleife keine aktiven Transportmechanismen nachweisen konnten. Ebenso wird aus morphologischen Untersuchungen /56/ wegen der sehr geringen Anzahl von Mitochondrien in den Zellen des dünnen Teils der Henle-Schleife die Vermutung geäußert, daß dieser Abschnitt des Nephrons nur in geringem Ausmaß zu aktiven Transportleistungen fähig sein sollte.

Da die hier vorgelegten Daten über intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen im dünnen Teil der Henle-Schleife von Interesse für die Funktion möglicher Konzentrierungsmechanismen in der inneren Medulla sind, sollen sie besonders kritisch überprüft werden. Einschränkend muß bemerkt werden, daß nur wenige Messungen in Kernen der dünnen Henle-Schleife vorliegen (Tab. 15 D), und daß die einzelnen Meßwerte stärkeren Schwankungen unterworfen sind. Diese sind zum Teil methodisch bedingt. Wie aus den Schnitten D bis F in Abb. 34 ersichtlich ist, sind die Zellen des dünnen Teils der Henle-Schleife sehr flach und haben nur einen verhältnismäßig kleinen Zellkern. Die hier bei der Analyse verwendeten Rasterfelder von 0.5 bis 1 μm^2 waren beträchtlich kleiner als

die bei den übrigen Messungen verwendeten Rasterfelder von 5 bis 10 μm^2 . Beim Einfrieren entstandene Inhomogenitäten, die sich sonst weitgehend herausmitteln, können darum bei Messungen im dünnen Teil der Henle-Schleife zu stärkeren Unterschieden der einzelnen Meßwerte führen. Weiter fällt auf, daß die Summe aus Na- und K-Konzentrationen intrazellulär fast immer um 10 bis 30% höher liegt als die Summe dieser Konzentrationen im umgebenden Interstitium. Es kann darum nicht ausgeschlossen werden, daß trotz der geringen Größe der Rasterfelder Elektrolytkristalle mit angeregt werden, die aus dem Tubuluslumen oder dem unmittelbar benachbarten Interstitium stammen und sich an den Zellmembranen niedergeschlagen haben.

Diese gegenüber dem Interstitium erhöhten Konzentrationen könnten allerdings auch durch eine geringe Zellschrumpfung hervorgerufen werden, die während des Einfrierens auftritt. Wenn eine solche Schrumpfung durch Wasserentzug beim Schockfrieren stattfindet, sollte sich dieser Effekt in kleinen Zellen stärker bemerkbar machen als in den deutlich größeren Zellen der übrigen Nephronabschnitte. Trotzdem bleibt unter Berücksichtigung aller möglicher Fehlerquellen der Befund bestehen, daß in den Zellen des dünnen Teils der Henle-Schleife in den Schichten E und F Na-Konzentrationen von mindestens 80 bis 150 mMol/kg FG vorkommen, die damit deutlich höher sind als im Sammelrohr.

7.4 Hinweise für einen aktiven Cl-Transport

Allgemein wird angenommen, daß sich Cl zwischen dem Extrazellulärraum und dem Cytosol von Zellen, die nicht aktiv Cl transportieren, passiv entsprechend der transmembranalen Potentialdifferenzen verteilt. Dagegen wurde aus transzellulären Potentialmessungen /9, 47/ und aus Mikropunktionsuntersuchungen /17/ sowohl für den dicken Teil der Henle-Schleife als auch für das Sammelrohr ein aktiver Cl-Transport postuliert. Da die mit der EMA gemessenen intrazellulären Cl-Konzentrationen von etwa 50 mMol/kg FG gerade in diesen Strukturen sehr viel höher sind, als es den zellulären Potentialen entspricht, erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß der aktive Transportschritt für Cl in diesen Zellen in der luminalen Membran lokalisiert ist.

7.5 Drei-Kompartiment-Modell

Von Curran, McIntosh, Diamond und Tormey /14, 15, 16/ wurde ein Drei-Kompartiment-Modell vorgeschlagen, um den isotonen Wassertransport aus dem proximalen Tubulus zu erklären. Nach diesem Modell sollte in den Interzellularspalten des basolateralen Labyrinths eine höhere Osmolarität als im Tubuluslumen und peritubulär herrschen. Darum sollten Messungen im basalen Cytosol, bei denen ein Gemisch aus intra- und extrazellulärer Flüssigkeit erfaßt wird, eine Summe aus Na- und K-Konzentrationen ergeben, die höher ist als der entsprechende Wert im umgebenden Interstitium. Bei unseren Messungen (Tab. 17) wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt, was aber wegen der geringen Anzahl der Messungen im basalen Cytosol und im Interstitium und wegen der zu erwartenden niedrigen Konzentrationsunterschiede /51/ nicht dagegen spricht, daß dieses Modell im proximalen Tubulus nicht verwirklicht sein könnte.

Erwähnenswert erscheint in diesem Zusammenhang der Befund, daß in der inneren Medulla (Schicht F) im basalen Cytosol des Sammelrohrs eine Summe aus Na- und K-Konzentrationen berechnet wird, die mit über 300 mMol/kg FG deutlich über dem interstitiellen Wert von etwa 210 mMol/kg FG liegt. Auch etwas weiter medial im Cytosol wird mit 220 mMol/kg FG noch ein Wert errechnet, der über dem Wert von 150 mMol/kg FG im Nucleus und im benachbarten Cytosol liegt.

Ein möglicher Einwand gegen diese hohen basalen Konzentrationen wäre, daß bei diesen Messungen - wie schon mehrmals erwähnt - artifiziell Elektrolytkristalle mit angeregt werden, die aus dem peritubulären Raum stammen und sich an die basale Zellmembran angelagert haben. Allerdings sollten dann solche Artefakte auch in der subkortikalen Zone (Schicht C) vorkommen, wo eine solche Anregung weder bei Messungen im proximalen Tubulus noch im Sammelrohr zu beobachten ist. Ein weiteres Argument gegen diesen Einwand liefert der Konzentrationsverlauf im Cytosol des Sammelrohrs, der auch noch etwa 1 μ m von der basalen Zellmembran entfernt ('Cytosol, med/bas' in Tab. 17) mit 220 mMol/kg FG gegenüber dem Wert im Nucleus und im benachbarten Cytosol erhöht ist und in dieser Tiefe kaum durch artifizielle Anregungen erklärt werden kann. Vielmehr

erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß in der inneren Medulla im Sammelrohr ein Transport von Na aus der Zelle in die Inter- und Intrazellulärspalten hinein existiert und so zu den beobachteten hohen Na-Konzentrationen im Bereich des basalen Cytosols führt.

Aufgrund der geringen Zahl der bisher vorliegenden Messungen in den inneren Schichten der Niere und der damit noch gegebenen statistischen Unsicherheit wäre es verfrüht, allzu genaue Angaben über intrazelluläre Konzentrationen und endgültige Aussagen über Funktionsmechanismen in diesen Strukturen der Niere zu machen. Jedoch dürften die vorgelegten Daten dazu beitragen, in Obereinstimmung mit bekanntem Wissensgut dieses zu festigen. In Strukturen wie in der inneren Medulla, in der mit den üblichen Untersuchungsmethoden bisher nur wenig differenzierte Messungen vorgenommen werden konnten, konnten Befunde erhoben werden, die eine intensivere Untersuchung lohnend erscheinen lassen. Als nächstes Ziel sollen darum Kontrollmessungen die vorgelegten Daten statistisch erhärten und Messungen in Nieren mit extremen Funktionszuständen weiteren Aufschluß über mögliche Funktionsmechanismen geben.

8 Zusammenfassung

Die Elektronenstrahlmikroanalyse eröffnet die Möglichkeit, sehr geringe Elementkonzentrationen in zellulären und subzellulären Kompartimenten zu messen. Bei der Verwendung eines energiedispersiven Nachweissystems zur Aufnahme und Analyse der anfallenden Röntgenstrahlen liegt das Meßergebnis als komplexes Spektrum vor. Die eigentliche Information stellen dabei die Intensitäten der in den Spektren enthaltenen elementcharakteristischen Linien dar.

Da sich die einzelnen Linien teilweise überlappen, und da sie bei geringen Elementkonzentrationen nur schwer von den statistischen Fluktuationen des unspezifischen Röntgenuntergrunds zu unterscheiden sind, mußte ein spezielles Auswertverfahren entwickelt werden. Bei diesem Verfahren wird ausgehend von physikalischen Grundlagen ein künstliches Spektrum berechnet, das dann durch Veränderung weniger Parameter (im Wesentlichen Variation der Höhen der Linien und des Untergrundes) an das gemessene Spektrum angepaßt wird. Aus den erhaltenen Parametern können dann die gesuchten Linienintensitäten sofort berechnet werden. Um dieses Auswertverfahren als schnelle und zuverlässige Routinemethode anwenden zukönnen, wurde ein Computerprogramm in FORTRAN geschrieben, das im on line-Betrieb die erforderlichen numerischen Berechnungen in wenigen Minuten durchführt.

Um aus den Linienintensitäten verlässliche Aussagen über die am Ort der Messung vorhandenen Elementkonzentrationen machen zu können, ist es nötig, daß das Meßverfahren linear arbeitet. Dazu wurden Untersuchungen durchgeführt, inwieweit die Meßdaten durch äußere Einflüsse wie Beschleunigungsspannung, Anordnung von Detektor und Probe und verschiedene Abbremsseffekte der Elektronen und Absorptionseffekte der Röntgenstrahlen beeinflußt werden. Aufgrund dieser Untersuchungen konnten Parameterbereiche und Bedingungen angegeben werden, unter denen eine direkte Proportionalität zwischen Elementkonzentrationen und Linienintensitäten zu beobachten ist.

Für die Quantifizierung, d.h. die Berechnung von Elementkonzentrationen aus den gemessenen Linienintensitäten, gab es bisher kein Verfahren, das zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse aus tieferen Gewebeschichten liefert. Darum wurde eine Methode entwickelt, die mithilfe von Serienschnitten und externen Standards eine Quantifizierung erlaubt.

Unter Verwendung dieses Quantifizierungsverfahrens war es möglich, in allen Schichten der Niere quantitative Messungen in den verschiedenen zellulären Strukturen vorzunehmen. Es konnte gezeigt werden, daß die Elektrolytkonzentrationen in den Zellen des proximalen und distalen Tubulus für Na deutlich niedriger und für K höher liegen, als sie bisher mit chemischen oder radiochemischen Methoden bestimmt wurden. Außerdem wurden Unterschiede in den Elektrolytkonzentrationen des proximalen und distalen Tubulus festgestellt. Diese intrazellulären Konzentrationen betragen im proximalen Tubulus für Na etwa 22, für Cl 15 und für K etwa 130 mMol/kg FG und im distalen Tubulus für Na etwa 8, für Cl etwa 11 und für K ungefähr 150 mMol/kg FG.

Im dicken Teil der Henle-Schleife und im Sammelrohr liegen in der Medulla die Cl-Konzentrationen mit etwa 50 mMol/kg FG auffällig hoch. Dieser Befund läßt vermuten, daß der aktive Cl-Transport, der für diese Epithelien postuliert wird, in der luminalen Zellmembran lokalisiert ist.

In der Medulla werden im Sammelrohr - mit Ausnahme der Papillenspitze - Na-Konzentrationen zwischen 10 und 20 mMol/kg FG gemessen. Dagegen steigt die intrazelluläre Na-Konzentration im dünnen Teil der Henle-Schleife von 70 auf über 200 mMol/kg FG zur Papillenspitze hin an. Dieser Befund könnte dafür sprechen, daß diese Zellen keinen nennenswerten aktiven Na-Transport aufweisen.

Im basalen Cytosol des Sammelrohrs wurden Na-Konzentrationen gemessen, die höher liegen als die entsprechenden Werte im luminalen Cytosol und im Interstitium. Diese Akkumulation von Na läßt eine Konzentrierung dieses Elements im basolateralen Labyrinth und in den Interzellularspalten vermuten.

9 Mathematischer Anhang

9.1 Absorption in inhomogenem Material

Wenn die Dicke eines Absorbers in Form einer Verteilungsfunktion $q(x)$ variiert, dann ergibt sich für die Transmissionsfunktion $T(E)$ die Formel

$$T(E) = \int_0^{\infty} dx \, q(x) e^{-x} m E^{-\delta} \quad (39)$$

mit der Nebenbedingung $\int_0^{\infty} dx \, q(x) = 1$.

Nun berechnen wir diese Transmissionsfunktion unter der Annahme, daß die Dicke des Absorbers um einen Mittelwert x_0 in Form einer Gaußverteilung variiert. Dann muß $q(x)$ ersetzt werden durch

$$q(x) = \frac{1}{\sqrt{\pi}\gamma} \exp\left(-\left[\frac{x-x_0}{\gamma}\right]^2\right) \quad (40)$$

Einsetzen von (40) in (39) ergibt nach der Auswertung des Integrals

$$T(E) = e^{-x_0} m E^{-\delta} \cdot e^{\gamma^2/4 \, m^2 E^{-2\delta}} \quad (41)$$

Unter der Zusatzannahme, daß die Dicke des Absorbers um x_0 in Form einer Normalverteilung mit der Standardabweichung Δx variieren soll, ergibt sich ein Zusammenhang zwischen γ und Δx als

$$2 \, \Delta x = 2 \, \sqrt{\ln 2} \, \gamma = 1.665 \, \gamma \quad \text{oder} \\ \gamma^2/4 = (\Delta x)^2/2.77 \approx (\Delta x)^2/3 \quad (42)$$

Damit ergibt sich die vollständige Transmissionsfunktion eines Absorbers, der um eine mittlere Dicke x mit der Standardabweichung Δx (exakt $0.95 \, \Delta x$) schwankt, als

$$T(E) = e^{-x} m E^{-\delta} \cdot e^{(\Delta x \, m E^{-\delta})^2/3} \quad (43)$$

9.2 Ersatz der Integration über die Absorptionskante durch die Fermi-Funktion

Die Funktion $S(E)$ sei eine Stufenfunktion mit dem Wert

$$S(E) = \begin{cases} 1 & \text{für } E < E_0 \\ 0 & \text{für } E > E_0 \end{cases} \quad (44)$$

Diese Funktion wird mit der Abbildungsfunktion $L^*(E)$

$$L^*(E, e) = \frac{1}{\sqrt{\pi}\gamma} \exp\left(-\left(\frac{E-e}{\gamma}\right)^2\right) \quad (6)$$

gefaltet, man erhält die Funktion

$$V(E) = \frac{1}{\sqrt{\pi}\gamma} \int_{-\infty}^{E_0} de \exp\left(-\left(\frac{e-E}{\gamma}\right)^2\right) \quad (45)$$

Die Fermifunktion $F(E)$

$$F(E) = \left[1 + \exp\left(\frac{E-E_K}{g}\right) \right]^{-1} \quad (11)$$

soll im Punkt $E = E_0$ denselben Funktionswert und dieselbe Steigung wie $V(E)$ haben. Aus den Ableitungen

$$V'(E) = \frac{\partial V(E)}{\partial E} = -\frac{1}{\sqrt{\pi}\gamma} \exp\left(-\left(\frac{E_0-E}{\gamma}\right)^2\right) \quad \text{und} \\ F'(E) = -\frac{1}{g} \exp\left(\frac{E-E_0}{g}\right) \left[1 + \exp\left(\frac{E-E_0}{g}\right) \right]^{-2} \quad (46)$$

erhält man an der Stelle $E = E_0$ die Gleichung

$$V'(E_0) = -\frac{1}{\sqrt{\pi}\gamma} \stackrel{!}{=} F'(E_0) = -\frac{1}{4g} \quad (47)$$

oder nach Einsetzen der entsprechenden numerischen Werte die Bedingung

$$g = 0.443 \gamma \quad (48)$$

10 Verzeichnis von Abkürzungen und Symbolen

B	Röntgenuntergrund ('background')
b	Verzweigungsverhältnis
C	gemessener Kanalinhalt eines Spektrums
E	Röntgenenergie
E_w	Kanalbreite
E_z	Nullpunktsenergie
E_o	Energie der anregenden Elektronen
E_{α}	Röntgenenergie der $K\alpha$ -Strahlung
E_{β}	Röntgenenergie der $K\beta$ -Strahlung
EDA	energiedispersive Analyse
EMA	Elektronenstrahl-Mikroanalyse
F	Fermifunktion
f	Beitrag des unsymmetrischen Linien-'Fusses'
F_w	Fluoreszenzwahrscheinlichkeit
g	Breite der Fermifunktion
H	Linienhöhe
I	berechneter Kanalinhalt eines Spektrums
L, L^*	Abbildungsfunktion
m	linearer Absorptionskoeffizient bei 1 keV
N	Parameter der Noise-Zacke
S	Produkt aus Röntgenuntergrund und Transmissionsfunktion
s	Ionisierungswahrscheinlichkeit für weiße Strahlung
s_c	Ionisierungswahrscheinlichkeit für charakteristische Strahlung
T	Transmissionsfunktion
TG	Trockengewicht
u	Unterrelaxationsfaktor
V	Eichfaktor für den Vergleich verschiedener Linienintensitäten
w_c	Emissionswahrscheinlichkeit für charakteristische Strahlung
WDA	wellenlängendispersive Analyse
x	Schichtdicke (absorbierender oder abbremsender Schichten)
Y	Umrechnungsfaktor von Intensitäten in Konzentrationen
Z	1) Ordnungszahl, 2) Summe der Abweichungsquadrate
γ	Peakbreite
δ	Energieabhängigkeit von μ^*
μ^*	linearer Absorptionskoeffizient (energieabhängig)
λ	Parameter für den Röntgenuntergrund

11 Literaturverzeichnis

- / 1/ Andersen C. A.: Electron probe microanalysis of thin layers and small particles with emphasis on light element determination. In: Quantitative Electron Probe Microanalysis, Ed. K.F.J. Heinrich. National Bureau of Standards Special Publication 298, p 269. Washington (1968)
- / 2/ Appleton T. C.: Cryoultramicrotomy, possible applications in cytochemistry. In: Electron Microscopy and Cytochemistry, p 229, Eds. E. Wisse, W. Th. Daems, I. Molenaar, P. van Duijn. Amsterdam, North-Holland Publishing Company (1973)
- / 3/ Appleton T. C.: A cryostat approach to ultrathin 'dry' frozen sections for electron microscopy: A morphological and X-ray analytical study. J. Microsc. 100, 49 (1974)
- / 4/ Bauer U.: Intrazelluläre Elektrolytverteilung in der Nierenrinde von Ratten. Diplomarbeit, Physiologisches Institut der Universität München (1976)
- / 5/ Bauer R., U. Bauer, H. Denecke, K. Thureau: Quantitative analysis of electrolytes in cells of rat kidney using electron microprobe. Pflüg. Arch. 368, R 12 (1977)
- / 6/ Bethe H. A.: Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskelstrahlung durch Materie. Ann. Phys. 5, 325 (1930)
- / 7/ Bethe H. A., W. Heitler
Proc. Roy. Soc. London, Ser. A, 146, 83 (1934)
- / 8/ Burg, M. B., J. Grantham, M. Abramow, J. Orloff:
Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. Amer. J. Physiol. 210, 1293 (1966)
- / 9/ Burg, M. B., N. Green: Function of the thick ascending limb of Henle's loop. Amer. J. Physiol. 224, 659 (1973)
- /10/ Burhop E. H. S.: The Auger-effect and other radiationless transitions. Camb. Univ. Press London, chap. 17.3 , London (1952)
- /11/ Castaing R.: Electronprobe microanalysis.
In: Advances in Electronics and Electron Physics. Ed. L. Marton. Acad. Press, New York (1970)

- /12/ Cerejido M., J. Reisin, C. A. Rotunno: The effect of sodium concentration on the content and distribution of sodium in the frog skin. *J. Physiol.* 196, 237 (1968)
- /13/ Christensen A. K.: Frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy, with a description of pancreas and liver. *J. Cell Biol.* 51, 772 (1971)
- /14/ Curran P. F., Mc Intosh J. R.: A model system for biological water transport. *Nature* 193, 347 (1962)
- /15/ Curran P. F.: Ion transport in intestine and its coupling to other transport processes. *Fed. Proc.* 24, 993 (1965)
- /16/ Diamond J. M., J. M. D. Tormey: Studies on the structural basis of water transport across epithelial membranes. *Fed. Proc.* 25, 1458 (1966)
- /17/ Diezi J., P. Michoud, J. Aceves, G. Giebisch: Micropuncture study of electrolyte transport across papillary collecting duct of the rat. *Amer. J. Physiol.* 224, 623 (1973)
- /18/ Dörge A.: Elektronenstrahlmikroanalyse von Elektrolyten zur Charakterisierung des transepithelialen Natriumtransports in der Froschhaut. Habilitationsschrift, Physiologisches Institut der Universität München (1974)
- /19/ Dörge A., K. Gehring, W. Nagel, K. Thureau: Localization of sodium in frog skin by electron microprobe analysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 281, 271 (1974)
- /20/ Dörge A., R. Rick, K. Gehring, J. Mason, K. Thureau: Preparation of biological soft tissue for electron microprobe analysis for electrolytes. *Cryobiology* 11, R 82 (1974)
- /21/ Dörge A., K. Gehring, W. Nagel, K. Thureau: Intracellular Na^+ - K^+ concentration of frog skin at different states of Na-transport. In: *Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissues*, p 337. Eds. T. Hall, P. Echlin, R. Kaufmann. Acad. Press, New York (1975)
- /22/ Dörge A., R. Rick, K. Gehring, K. Thureau: Preparation of freeze-dried cryosections for quantitative X-ray microanalysis of electrolytes in biological soft tissues. *Pflüg. Arch.* 373, 85 (1978)

- /23/ Duncumb P.: Improved resolution with the X-ray scanning micro-analyzer. Proc. 2nd Int. Symp. X-Ray Microscopy and X-Ray Microanalysis, Stockholm 1959. Eds. A. Engström, V. E. Coslett, H. Pattee. Elsevier, Amsterdam (1960)
- /24/ Erlij D., M. W. Smith: Sodium uptake by frog skin and its modification by inhibitors of transepithelial sodium transport. J. Physiol. 228, 221 (1973)
- /25/ Giebisch G., R. M. Klose, G. Malnic, W. J. Sullivan, E. E. Windhager: Sodium movement across single perfused proximal tubules of rat kidney. J. Gen. Physiol. 47, 1175 (1964)
- /26/ Giebisch G.: Functional organisation of proximal and distal tubular electrolyte transport. Nephron 6, 260 (1969)
- /27/ Grantham J. J., C. M. Lowe, M. Dellasega, B. R. Cole: Effect of hypotonic medium on K and Na content of proximal renal tubules. Amer. J. Physiol. 232, F 42 (1977)
- /28/ Hall T. A.: Some aspects of microprobe analysis of biological specimens. In: Quantitative Electron Probe Microanalysis. Ed. K. F. J. Heinrich. National Bureau of Standards Special Publication 298, p 269. Washington (1968)
- /29/ Hall T. A., H. J. Höhling: The application of microprobe analysis to biology. In: X-Ray Optics and Microanalysis. Eds. C. Möllenstedt, K. H. Gaukler. Springer, Berlin, p 582 (1969)
- /30/ Hall T. A.: Preparation and examination of biological samples. 7th Nat. Conf. Electron Probe Analysis, p 40. San Francisco (1972)
- /31/ Imai M., J. P. Kokko: Mechanism of sodium and chloride transport in the thin ascending limb of Henle. J. Clin. Invest. 58, 1054 (1976)
- /31/ Ingram F. D., M. J. Ingram, C. A. M. Hogben: An analysis of the freeze-dried plastic embedded electron probe specimen preparation. In: Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissues. Eds. T. Hall, P. Echlin, R. Kaufmann, p 119. Academic Press, New York (1974)
- /32/ Jackson J. D.: Classical Electrodynamics, p 372. J. Wiley, New York (1967)

- /33/ Khuri R. N., S. K. Agulian, A. Kalloghlian: Intracellular potassium in cells of the distal tubule.
Pflüg. Arch. 335, 297 (1972)
- /34/ Khuri R. N.: Intracellular potassium in single cells of renal tubules.
In: International Workshop on Ion Selective Electrodes in Biology and Medicine. Ed. M. Kessler. Urban & Schwarzenbeck, München (1974)
- /35/ Kriz W.: Der architektonische und funktionelle Aufbau der Ratten-
niere. Z. f. Zellforschung 82, 495 (1967)
- /36/ Kriz W., J. Schnermann, H. J. Höhling, A. P. v. Rosenstiel, T. A.
Hall: Electron probe microanalysis of electrolytes in kidney cells.
In: Recent Advances in Renal Physiology, Int. Symp. on Renal Hand-
ling of Sodium, Brestenberg 1971, p 162. Karger, Basel (1972)
- /37/ Koepsell H., W. A. P. Nicholson, W. Kriz, H. J. Höhling: Measure-
ments of exponential gradients of sodium and chlorine in the rat
kidney medulla using the electron microprobe.
Pflüg. Arch. 350, 167 (1974)
- /38/ Kokko J. P.: Sodium chloride and water transport in the descending
limb of Henle. J. Clin. Invest. 49, 1838 (1970)
- /39/ Lechene C. P., J. V. Bonventre: Electron probe study of the urinary
concentrating mechanism. Elemental cortico-papillary gradient in
frozen hydrated rat kidney. Proc. 11th Conf. Microbeam Analysis
Society, p 61. Miami Beach (1976)
- /40/ Marshall D. J., T. A. Hall: Electron-probe X-ray microanalysis of
thin films. Brit. J. Appl. Physiol. 1, 1651 (1968)
- /41/ Marshall D. J., A. Wright: Detection of diffusible ions in insect
osmoregulatory systems by electron probe X-ray microanalysis using
scanning electron microscopy and a cryoscopic technique.
Microan. 4, 31 (1973)
- /42/ Maunsbach A. B., S. I. Madder, H. Latta: Variations in fine struc-
ture of renal tubular epithelia under different conditions of
fixation. J. Ultrastruct. Res. 6, 511 (1962)
- /43/ Moseley H. G.: The high frequency spectra of the elements.
Phil. Mag. 26, 1024 (1913) und 27, 703 (1914)

- /44/ Peter K.: Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere.
G. Fischer, Jena (1909)
- /45/ Reed S. J. B.: Spatial resolution in electron probe microanalysis
In: X-Ray Optics and Microanalysis, 4th Int. Conf, Orsay 1965.
Eds. R. Castaing, P. Deschamps, J. Philibert, p 339.
Hermann, Paris (1966)
- /46/ Rick R., A. Dörge, E. v. Arnim, K. Thureau: Electron microprobe
analysis of frog skin epithelium: Evidence for a syncytial Sodium
transport compartment. *J. Memb. Biol.* 39, 313 (1978)
- /47/ Rocha A. S., J. P. Kokko: Sodium chloride and water transport in
the medullary thick ascending limb of Henle.
J. Clin. Invest. 52, 612 (1973)
- /48/ Ruiz-Guinazu A., E. E. Arrizuieta, L. Yelinek: Electrolyte, water
and urea content in dog kidneys in different states of diuresis.
Amer. J. Physiol. 206, 725 (1964)
- /49/ Rouffignac C. de, F. Morel, N. Moss, N. Roinel: Micropuncture
study of water and electrolyte movements along the loop of Henle
in *Psammomys* with special reference to Magnesium, Calcium and
Phosphorus. *Pflüg. Arch.* 344, 309 (1973)
- /50/ Salem S. I.: Radiative transition probabilities for X-ray lines.
In: Handbook of Chemistry and Physics, p E-195, Ed. R. C. Weast.
CRC Press Cleveland (1975)
- /51/ Schafer J. A., S. L. Troutman, T. E. Andreoli: Hydraulic conduc-
tance of isolated proximal convoluted tubules.
Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 37, 727 (1978)
- /52/ Sommerfeld A.: Über die Beugung und Bremsung der Elektronen.
Ann. Phys. 11, 257 (1931)
- /53/ Storm E., H. I. Israel: Mass absorption coefficients.
Nucl. Data Tab. A 7, 566 (1970)
- /54/ Stumpf W. E., L. J. Roth: High resolution autoradiography with
dry mounted freeze-dried frozen sections. Comparative study of
six methods using two diffusible compounds 3-H-estradiol and 3-H-
mesobilirubinogen. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 274 (1966)

- /55/ Sullivan W. J.: Electrical potential differences across distal renal tubules of *Amphiuma*. *Amer. J. Physiol.* 214, 1096 (1968)
- /56/ Tisher C. C.: Anatomy of the kidney.
In: *Kidney I*, Eds. B. M. Brenner, F. C. Rector, p 35.
Saunders Comp., Philadelphia (1976)
- /57/ Tousimis A. J.: Electrolytes in cells of biological tissues.
7th Nat. Conf. Electron Probe Analysis, San Francisco, p 47 (1972)
- /58/ Wiederholt M., W. J. Sullivan, G. Giebisch: Potassium and sodium transport across distal tubules of *Amphiuma*.
J. Gen. Physiol. 57, 495 (1971)
- /59/ Wiederholt M., S. K. Agulian, R. N. Khuri: Intracellular potassium in the distal tubule of the adrenalectomized and aldosterone treated rat. *Pflüg. Arch.* 347, 117 (1974)
- /60/ White J. F.: Intracellular potassium activities in *Amphiuma* small intestine. *Amer. J. Physiol.* 231, 1214 (1976)
- /61/ Whitttembury G.: Sodium and water transport in kidney proximal tubular cells. *J. Gen. Physiol.* 51, 303s (1968)
- /62/ Varan R., P. D. Peters, T. A. Hall: Effect of glutaraldehyd and urea embedding on intracellular ionic elements. X-ray microanalysis of sceletal muscle and myocardium. *J. Ultrastruc. Res.* 49, 405 (1974)

Bei Herrn Prof. Dr. K. Thureau möchte ich mich herzlich für die interessante Themenstellung, sein Interesse an meiner Arbeit und für kritische Diskussionen bedanken.

Herrn Dr. R. Rick und besonders Herrn Dr. A. Dörge bin ich für zahlreiche wertvolle Hinweise und Anregungen zu Dank verpflichtet.

Meiner Frau Dipl.biol. U. Bauer danke ich für die sorgfältige Herstellung vieler Gefrierschnitte.

Lebenslauf

Am 03.06.1946 wurde ich als Sohn des damaligen Forstmeisters Friedrich Bauer und seiner Frau Anni, geb. Erf, in Ingolstadt geboren. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit. Seit 1974 bin ich mit Ulrike Bauer, geb. Kroll, verheiratet.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Gunzenhausen, von 1956 bis 1965 das Humanistische Gymnasium in Ansbach. Nach dem Abitur 1965 leistete ich von 1965 bis 1967 zwei Jahre Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

1967 begann ich mit dem Studium der Physik an der Technischen Universität Stuttgart. Dort legte ich 1969 das Vordiplom ab und wechselte dann an die Technische Universität München, an der ich 1972 das Diplom im Fach Physik ablegte.

Von 1972 bis 1978 studierte ich an der Universität München Medizin. 1978 beendete ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen und erhielt die Approbation als Arzt.

Parallel zum Medizinstudium arbeitete ich seit 1972 als wissenschaftlicher Assistent. Zuerst war ich zwei Jahre am Institut für Theoretische Physik der Technischen Universität München und von 1974 bis 1978 am Institut für Physiologie der Universität München tätig. Seit Dezember 1978 bin ich am Institut für Nuklearmedizin der Technischen Universität München angestellt.

